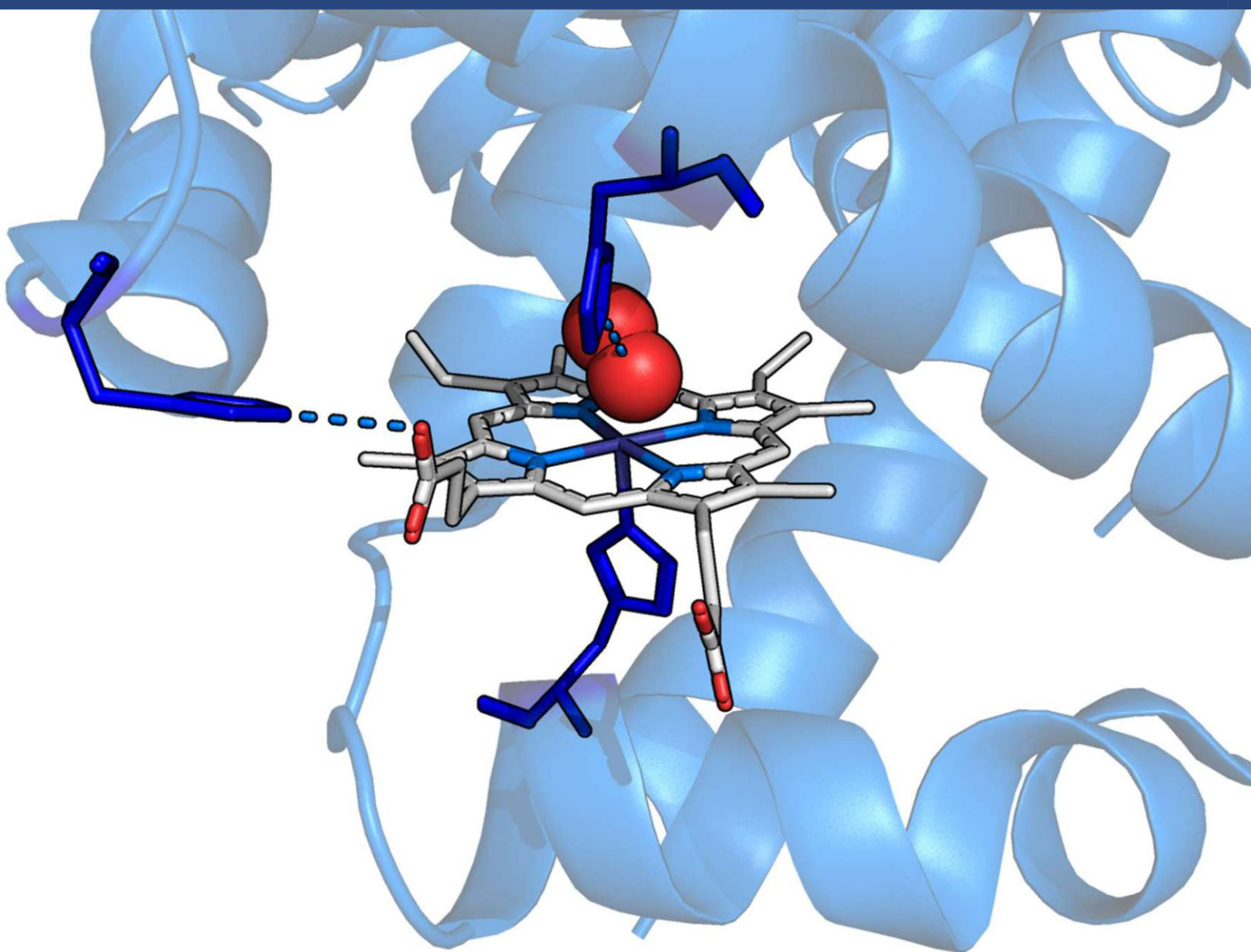


RADU SILAGHI-DUMITRESCU, DANIELA CIOLOBOC,  
MARIANN ÁRKOSI, NICOLETA TOMOIOAGĂ

# METALELE ÎN SISTEMELE VII

• EDIȚIA A II-A



PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ

**Radu Silaghi-Dumitrescu, Daniela Cioloboc,  
Mariann Árkosi, Nicoleta Tomoioagă**

**METALELE ÎN SISTEMELE VII**  
**– ediția a II-a –**

**PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ**

**2023**

**Referenți științifici:**

**Conf. dr. Alexandru Lupan**

**Prof. Habil. Dr. Ing Csaba Paizs**

*Aceasta este ediția a doua a unui text destinat în primul rând celor interesați a afla mai multe despre rolurile metalelor în sistemele vii – indiferent de nivelul de educație sau domeniul de interes profesional. Se dorește în același timp ca textul să fie și o referință utilă pentru studenții din științele exacte care studiază chimia bio-anorganică și zonele conexe. Autorii aduc mulțumiri pentru discuții utile colegilor din cadrul Facultății de Chimie și Inginerie Chimică – prof Csaba Paizs, dr. Adrian Brânzanic, Maria Lehene, Cezara Zăgrean-Tuza, Alexandru Sonica și alți membri ai grupului de chimie bioanorganică din cadrul FCIC a UBB.*

**ISBN 978-606-37-1937-0**

DOI: <https://doi.org/10.52257/9786063719370>



*This work is licensed under a CC BY-NC-ND 4.0 license.  
(Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International).*

*To learn more about the CC licensing, please visit  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>*

**Tehnoredactare computerizată: Cristian-Marius Nuna**

**Universitatea Babeș-Bolyai**

**Presa Universitară Clujeană**

**Director: Codruța Săcelean**

**Str. B.P. Hasdeu nr. 51**

**400371 Cluj-Napoca, România**

**Tel./fax: (+40)-264-597.401**

**E-mail: [editura@editura.ubbcluj.ro](mailto:editura@editura.ubbcluj.ro)**

**<http://www.editura.ubbcluj.ro/>**

## Cuprins

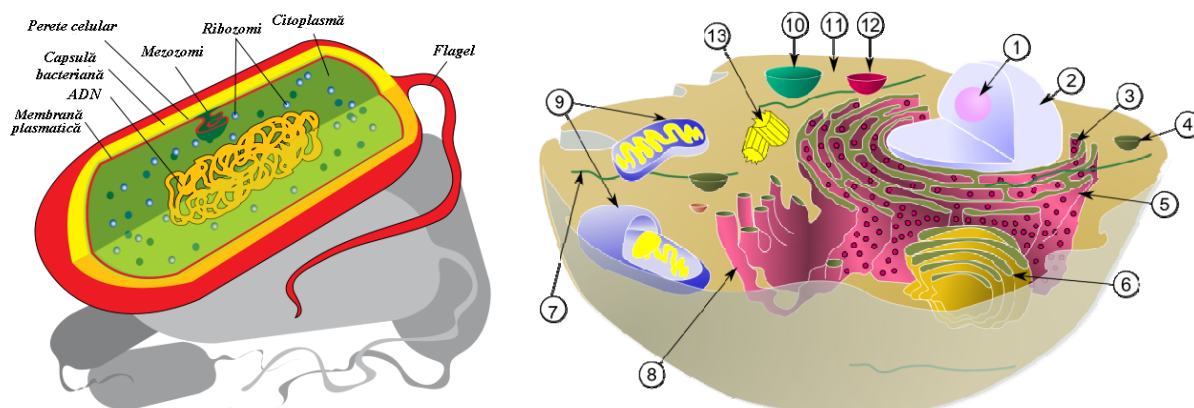
1. Introducere .....	6
2. Elemente metodologice de bază în chimia bioanorganică .....	8
2.1. Considerente asupra proprietăților chimice ale metalelor importante în organismele vii .....	8
2.1.1. Liganzi, duritate, stări de spin .....	8
2.1.2. Abundența naturală și în organismele vii .....	12
2.2. Purificarea și analiza compușilor metalici din organismele vii .....	15
2.2.1. Din sursa originală .....	16
2.2.2. Prin metode recombinate .....	16
2.2.3. Cultivarea .....	17
2.2.4. Izolarea proteinei de interes .....	17
2.2.5. Metode de purificare .....	18
2.2.6. Analiza elementală .....	20
2.2.7. Crearea de metaloproteine artificiale .....	21
2.3. Compuși sintetici, compuși model .....	21
2.4. Spectroscopia de absorbție electronică moleculară și metodele înrudite (UV-vis, CD, MCD, VT/VH-MCD, fluorescență) .....	21
2.4.1. Spectroscopia UV-vis .....	22
2.4.2. Spectroscopia de dicroism circular (CD) .....	24
2.4.3. Dicroismul magnetic circular (MCD, VT/VH-MCD) .....	24
2.4.4. Fluorescența .....	25
2.5. Spectroscopia vibrațională (IR, rezonanță Raman) .....	26
2.6. Spectroscopia Mössbauer .....	27
2.7. Spectroscopia de rezonanță electronică paramagnetică (REP, RES) .....	28
2.8. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN) .....	29
2.9. Spectroscopia de absorbție de raze X (XAS, EXAFS) .....	31
2.10. Difrakția de raze x pe monocristal și alte metode structurale .....	32
2.11. Metode speciale pentru analiza speciilor instabile ale metalelor .....	33
2.11.1. Lucrul la temperaturi joase .....	33
2.11.2. Tehnici ultrarapide – <i>stopped-flow, flow, jump, flash</i> .....	33
2.12. Liganzi sondă .....	34
2.13. Chimia computațională .....	35
3. Proteine specializate în legarea și transportul oxigenului .....	39
3.1. Globine .....	39

3.2. Hemeritrine .....	47
3.3. Hemocianine .....	48
3.4. Proteine-senzor pentru O <sub>2</sub> și molecule înrudite .....	48
4. Proteine care activează oxigenul molecular .....	50
4.1. Superoxid dismutaze .....	50
4.2. Superoxid reductaze .....	52
4.3. Peroxidaze .....	53
4.4. Catalaze .....	55
4.5. Oxigenaze .....	55
4.5.1. Monooxigenaze heminice – citocromii P450 .....	55
4.5.2. Oxigenaze cu fier non-heminic .....	57
4.5.3. Oxigenaze cu cupru .....	60
4.5.4. Oxigenaze cu mangan sau nichel .....	62
4.5.5. Oxigenaze non-metalice .....	62
5. Proteine transportoare de electroni și enzime înrudite cu acestea .....	63
5.1. Proteine cu fier și sulf .....	63
5.2. Citocromi .....	64
5.3. Proteine albastre cu cupru .....	66
5.4. Transportori de electroni non-metalici .....	66
6. Respirația .....	67
7. Wolframul, molibdenul: oxigenare fără O <sub>2</sub> .....	71
8. Sodiul, potasiul, calciul, magneziul și elementele înrudite: echilibre osmotice, semnalizare, cataliză .....	73
9. Proteine implicate în ciclul azotului; alte cicluri similare .....	77
10. Hidrogenaze, metanogeneza .....	81
11. Molecule-traficant, molecule-depozit .....	83
12. Hidrolaze, hidrataze .....	86
12.1. Enzime/proteine cu zinc .....	86
12.2. Hidrolaze sau hidrataze cu alte metale decât zincul .....	88
13. Elemente de chimie bio-organometalică. Vitamina B <sub>12</sub> .....	91
14. Proteine implicate în fotosinteză .....	95
15. Metalele în medicamente și în agenți de diagnostic medical .....	100
16. Biosinteza centrilor metalici în proteine .....	106
17. Biominerale .....	107

18. Dezechilibre ale nivelului metalelor în organism: implicații medicale .....	108
18.1. Dezechilibre ale fierului .....	108
18.1.1. Excesul de fier .....	109
18.1.2. Deficitul de fier .....	110
18.2. Dezechilibre ale cuprului .....	110
18.2.1. Excesul de cupru .....	111
18.2.2. Deficitul de cupru .....	112
18.3. Dezechilibre ale calciului .....	113
18.3.1. Excesul de calciu .....	113
18.3.2. Deficitul de calciu .....	114
18.4. Dezechilibre ale magneziului .....	115
18.4.1. Excesul de magneziu .....	115
18.4.2. Deficitul de magneziu .....	116
18.5. Dezechilibre ale sodiului .....	117
18.5.1. Excesul de sodiu .....	117
18.5.2. Deficitul de sodiu .....	118
18.6. Dezechilibre ale potasiului .....	119
18.6.1. Excesul de potasiu .....	119
18.6.2. Deficitul de potasiu .....	120
18.7. Dezechilibre ale zincului .....	121
18.8. Cromul .....	122
18.9. Cadmiul .....	123
18.10. Nichelul .....	123
Bibliografie .....	125

# 1. Introducere

Sistemele vii, așa cum le definim din punct de vedere biochimic (entități cu grad înalt de organizare, în care fiecare parte are o funcție, în care există o relație directă între funcție și structură, care sunt capabile să extragă energie din mediu, care se pot replica și care sunt capabile de adaptare la mediu), au o compoziție chimică variabilă inclusiv în funcție de specie sau chiar de individ și respectiv de condițiile în care acesta se dezvoltă. Acele sisteme vii care ne sunt cunoscute până astăzi tind însă să aibă elemente structurale comune, după cum se ilustrează în Figura 1-1. Astfel, chiar și cele mai simple sisteme sunt organizate în celule delimitate de o membrană formată prin asocierea necovalentă a unor lipide. Amestecul chimic delimitat de această membrană este denumit generic citosol; el include de obicei majoritatea moleculelor necesare supraviețuirii, dezvoltării și reproducerii celulei. Aceste molecule tind să se constituie în câteva clase de compuși comuni tuturor organismelor vii cunoscute. În general cea mai abundentă moleculă dintr-o celulă este apa. Rolul ei este esențial în organismele vii atât ca solvent și agent de stabilizare a structurii restului „biomoleculelor”, cât și ca participant direct în reacții esențiale pentru funcționarea celulei.<sup>1</sup>



**Figura 1-1. Reprezentări schematice ale unor celule vii. Stânga: celulă de tip procariot. Dreapta: celulă organizată superior (eucariot), cu (1) nucleol (2) nucleu (3) ribozomi (4) vezicule, (5) reticul endoplasmatic rugos, (6) aparatul Golgi, (7) citoschelet, (8) reticul endoplasmatic neted, (9) mitocondrie, (10) vacuole, (11) citoplasmă, (12) lizozom, (13) centriol.<sup>2,3</sup>**

Într-o celulă tipică, a doua clasă ca abundență o constituie proteinele (de regulă cel puțin câteva mii de proteine diferite din punct de vedere al compoziției chimice și al concentrației sunt prezente într-o celulă), urmate de acizii nucleici (ADN și ARN, acesta din urmă fiind prezent sub forma câtorva mii de molecule diferite între ele) și apoi de lipide. De asemenea, în celulă sunt prezente alte câteva sute de molecule mici, a căror utilitate este de produși intermediari de reacție (exemplu, adenzin-trifosfatul, ATP, sintetizat pentru a depozita într-o formă ușor accesibilă energia chimică eliberată din diverse reacții chimice, sau amidonul sintetizat ca formă de depozitare a glucozei), sau sursă de energie (exemplu, glucoza), sau sursă de atomi necesari construirii/bunei funcționări a celulei (exemplu, dioxidul de carbon în frunzele plantelor), sau

rol structural (exemplu, trehaloza, o glucidă folosită pentru reglarea presiunii osmotice în unele organisme). Cu excepția notabilă a apei, toate moleculele de mai sus din punct de vedere chimic, sunt compuși organici (construite așadar pe schelete de atomi de carbon și folosind ca accesorii alte nemetale). Trebuie însă să menționăm că multe dintre ele nu și-ar putea menține structura sau executa funcția *in vivo* fără asistența/prezența unor ioni metalici. Astfel, după știința noastră, *nu există azi vreun sistem viu capabil să funcționeze în absența tuturor metalelor*.<sup>1</sup>

Lucrarea de față, ca revizuire a Ediției I,<sup>4</sup> își propune să prezinte cititorilor o vedere de ansamblu, nicidecum exhaustivă, a tipurilor de procese în care sunt implicate metalele în sistemele vii. Acest domeniu de interes, aflat la intersecția dintre biochimie și chimia anorganică, este definit de specialiști drept chimie bioanorganică (scris și bio-anorganică), sau chimie anorganică biologică, sau biochimie anorganică (fiecare dintre aceste variante de terminologie plasând mai mult sau mai puțin accent către una dintre disciplinele fundamentale de la care derivă – fie biologia, fie chimia, fie biologia moleculară, fie chimie coordinativă etc.). Pe parcursul lucrării se va presupune că cititorul are cunoștințe de bază de chimie și biologie în măsura în care acestea se predau la nivel preuniversitar în România. Pentru parcurgerea în detaliu a anumitor pasaje se recomandă și cunoștințe sumare de biochimie, așa cum sunt ele prezentate în numeroasele texte introductive de biochimie accesibile în prezent (dintre care recomandăm cititorului referința 1 din lista de bibliografie prezentă la finalul acestei lucrări). În primele capitole vom recapitula câteva noțiuni de bază de metodologie (spectroscopie, chimie teoretică) utile în primul rând studenților care doresc să dedice timp lucrului în domeniul chimiei bioanorganice. Restul capitolelor prezintă diversele clase de procese din sistemele vii în care metalele joacă un rol important.



## **2. Elemente metodologice de bază în chimia bioanorganică**

În majoritatea cazurilor, metalocomplecșii cu relevanță biologică (fie ei metaloproteine, sau compuși de sinteză, sau de altă natură) sunt disponibili în laboratorul de cercetare în cantități limitate, de obicei sub forma unor soluții relativ diluate (concentrații în domeniul  $\mu\text{M}$ - $\text{mM}$ ). Metodele de purificare a acestora sunt similare celor aplicate majorității biomoleculelor și sunt discutate ca atare în detaliu în referința 1. În cele ce urmează se discută câteva principii și metode experimentale de bază aplicabile metaloproteinelor și complecșilor înrudiți.

### **2.1. Considerente asupra proprietăților chimice ale metalelor importante în organismele vii**

#### **2.1.1. Liganzi, duritate, stări de spin**

Diversele molecule sau ioni coordinați la metale sunt denumiți generic liganzi – cu observația că în biochimie termenul de ligand este folosit și cu alt sens – acela de moleculă/ion legat la o moleculă mai mare (în special la proteine).

Conceptul HSAB (Hard Soft Acid Base – teoria acizilor/bazelor moi/dure) este util în înțelegerea rolului biologic al metalelor. Principiul HSAB prezice ce liganzi sunt preferați de un ion metalic. Centrii duri („hard”) sunt definiți ca aceia al căror nor electronic nu este deformabil sub influența partenerilor de legătură. Centrii moi („soft”) sunt aceia al căror nor electronic este relativ deformabil. Metalele dure preferă liganzi duri (iar legăturile metal-ligand aferente au caracter predominant ionic, în care norii electronici ai celor doi ioni rămân neafecțați de către prezența partenerului de legătură), iar cele moi preferă liganzi moi (iar aici natura legăturii capătă un semnificativ caracter covalent, norii electronici ai celor doi parteneri deformându-se astfel încât să pună în comun electroni în spațiul dintre cei doi parteneri de legătură). Duritatea unui centru metalic se corelează direct cu sarcina electrică și invers cu raza/volumul: cu cât sarcina pozitivă a metalului este mai mare, respectiv cu cât sarcina este concentrată într-un volum mai mic, cu atât norul electronic va fi legat mai strâns în jurul nucleului, deci va fi mai greu de deformat. Metalele alcaline și alcalino-pământoase (ex.,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) sunt centri duri. Dintre liganzi, cei pe bază de oxigen sau azot (în special neutri) sunt de asemenea centri duri. La metalele tranziționale active redox duritatea depinde de starea de oxidare (ex.,  $\text{Fe(III)}$  este mai dur decât  $\text{Fe(II)}$ ).

În majoritatea sistemelor chimice electronii sunt așezați împerecheați câte doi în orbitali atomici sau moleculari (fie ei de legătură, de antilegătură, sau de nelegătură). Electronul are un moment magnetic propriu; în aceste perechi de electroni din orbitali, momentele magnetice ale celor doi electroni se anulează reciproc, astfel încât din afara orbitalului proprietățile magnetice ale celor doi electroni nu sunt observabile. În cazuri rare însă, un sistem chimic poate conține orbitali incomplet ocupați (adică având un singur electron în loc de doi). În aceste cazuri, sistemul respectiv dobândește proprietăți magnetice măsurabile. Spunem atunci despre


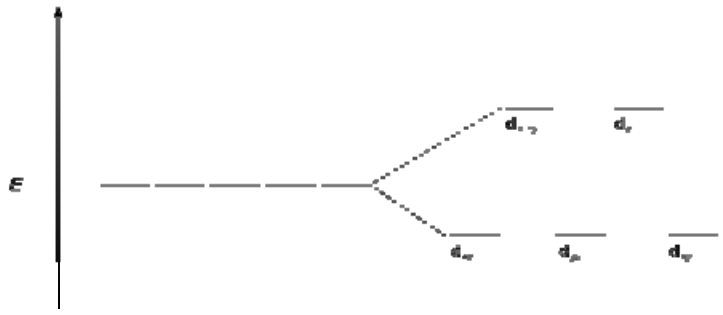
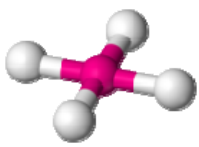
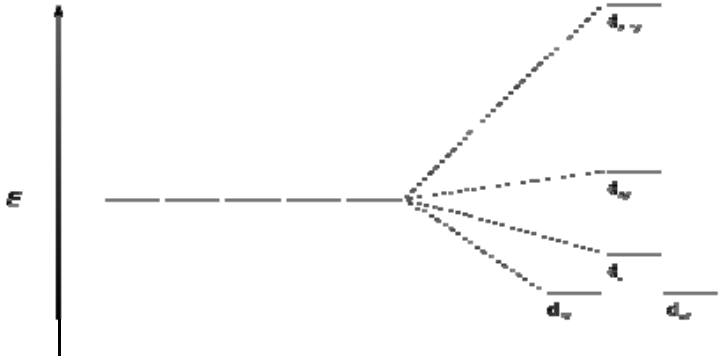
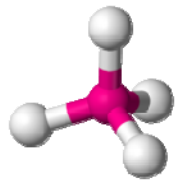
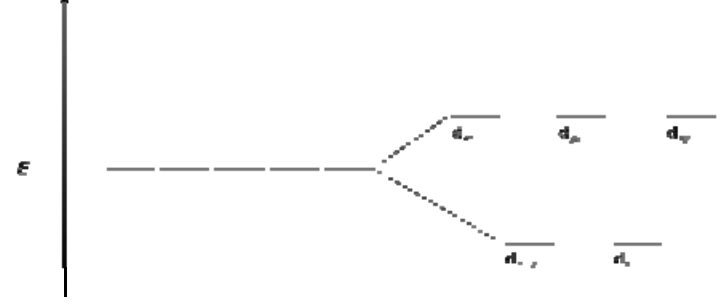
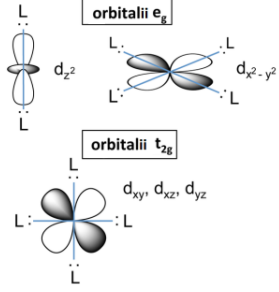
acesta că este paramagnetic, în timp ce sistemele fără electroni neîmperecheați sunt denumite diamagnetice. Pentru sistemele paramagnetice organice, folosim termenul de radical liber. Sisteme cu electroni neîmperecheați se întâlnesc însă adesea și la centrii metalici, de exemplu când ei au stratul d incomplet ocupat. Pentru a indica numărul de electroni neîmperecheați, se folosește adesea notația  $S=n/2$ , unde  $n$ =numărul de electroni neîmperecheați (și se simplifică în cazul valorilor pare; așadar,  $S$  poate fi 0, 1/2, 1, 3/2, 2 etc.).

Spre deosebire de elementele din blocul p (carbonul în special), metalele tranziționale formează legături predominant ionice (și nu covalente prin punerea în comun de electron neîmperecheat cu electronul neîmperecheat al ligandului), ceea ce înseamnă că în general electronii neîmperecheați ai metalelor tind să rămână neîmperecheați inclusiv după coordinarea la liganzi. Se folosește terminologia  $d^n$ , unde  $n$  reprezintă numărul de electroni din stratul d respectiv (și similar vor apărea electroni neîmperecheați la elementele mai grele, care folosesc stratul f – lantanide, actinide). Acolo unde  $n$  este impar, în mod evident ionul/elementul va avea cel puțin un electron neîmperecheat. Mai mult, datorită regulii lui Hund, într-un ion metalic izolat numărul de electroni neîmperecheați din orbitalii d va fi egal cu  $n$  pentru  $n=1-5$ , respectiv cu  $n-5$  pentru  $n=6-9$  – de vreme ce orbitalii d sunt 5 la număr și într-un ion izolat energiile lor sunt egale între ele. Totuși, în compușii coordinativi liganzii din jurul metalului afectează în general energiile orbitalilor d ai metalului în măsură diferită în funcție de axele pe care se află fiecare orbital, conform Teoriei Câmpului Cristalin. În această teorie, sarcina electrică negativă a ligandului (considerat punctiform pentru simplitate), manifestă repulsie electrostatică față de electronii d ai metalului – o repulsie cu atât mai mare cu cât electronii sunt orientați pe direcții/axe mai apropiate de cele pe care se află ligandul. Această „afectare” se traduce în faptul că un electron al metalului va prefera să se așeze în orbitali cât mai depărtați de ligand – sau, cu alte cuvinte, va plăti un cost energetic cu atât mai mare cu cât orbitalul este mai afectat de către ligand. Reformulat, aceasta înseamnă că energiile orbitalilor d sunt în general mai mari în complecși decât în ionul liber – dar și că, mai important, energia fiecărui orbital d poate fi afectată în mod diferit de ligand. Prin urmare, cei cinci orbitali d nu mai sunt degenerați energetic (adică, nu mai au toți aceeași energie). Exemple tipice de situații se ilustrează în Tabelul 2-1. Astfel, într-un sistem octaedric orbitalii  $d_{x^2-y^2}$  și  $d_{z^2}$  sunt mai afectați deoarece lobi lor sunt plasați direct pe axele x, y și z – adică aceleași axe pe care se află și liganzii. O situație similară se întâlnește în geometria plan-pătrată, doar că acum orbitalul  $d_{z^2}$  nu mai este afectat deoarece pe axa verticală (z) nu mai avem ligand. Prin contrast, în geometria tetraedrică liganzii sunt așezați între axele x/y/z și nu pe ele – astfel încât acum  $d_{x^2-y^2}$  și  $d_{z^2}$  sunt orbitalii favorizați energetic în comparație cu ceilalți 3 ( $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ).

În condiții precum cele din Tabelul 2-1, regula lui Hund rămâne aplicabilă, dar acum diferența de energie dintre seturile de orbitali face să putem așeza electronii în mai multe feluri, în funcție de geometria de coordinare și de cât de puternic a fost efectul câmpului de liganzi. Diferența de energie dintre cele două (sau, după caz, mai multe) seturi de orbitali d într-un anumit sistem de coordinare (diferență etichetată/reflectată în diverși parametri numerici, dintre care vom folosi LFSE – ligand field stabilization energy) depinde de doi factori: natura metalului (de ex., metalele 4d și 5d prezintă diferențe mai mari decât cele 3d) și natura ligandului. Pentru acesta din urmă, sunt spre exemplu importante sarcina negativă și concentrarea ei pe axa de coordinare, dar și distanța la care se află ligandul de metal. Liganzii anionici vor

avea efecte mai puternice decât cei neutri, iar liganzii care se apropie mai mult de metal (de exemplu, cianura) vor avea efecte mai puternice decât cei care stau la distanță mai mare.

**Tabelul 2-1. Rearanjarea energetică a orbitalilor d sub influența liganzilor, potrivit teoriei câmpului cristalin.<sup>5</sup>**

Reprezentare grafică	Diagramă de energie
<p>Octaedru</p> 	
<p>plan pătrat</p> 	
<p>tetradedru</p> 	
	

La ocuparea orbitalilor d cu mai mult de un electron vom asista atunci la o competiție între costul energetic implicat de încălcarea legii lui Hund și costul energetic implicat de trecerea la un orbital d de energie mai mare. Acolo unde LFSE are valori mici, sistemul se va comporta ca și când LFSE nici n-ar exista. La valori mai mari ale LFSE, sub-seturile de orbitali d (ex.,  $t_{2g}$  vs.  $e_g$ ) se vor comporta ca seturi independente unul de celălalt astfel încât regula lui Hund

se va aplica numai în interiorul sub-setului. Spre ilustrare, Figura 2-1 prezintă modurile posibile de aranjare a electronilor pentru centrii  $d^1$ - $d^{10}$  în sistem de coordinare octaedric. Pentru centrii  $d^1$ - $d^3$  și  $d^8$ - $d^{10}$ , numărul de electroni neîmperecheați este același ca pentru ionul liber. Pentru centrii  $d^8$ - $d^{10}$  apar însă două posibilități: LFSE mic/neglijabil (rândul de sus) vs. LFSE mare (rândul de jos). În versiunea a doua, o parte dintre electroni sunt obligați să se împerecheze, costul energetic al accesării orbitalilor  $e_g$  fiind prea mare. Numim stările de pe rândul de jos, care au un număr mai mic de electroni neîmperecheați, „stări de spin jos”, iar pe celelalte „de spin înalt”. Terminologia e valabilă pentru orice stare de coordinare, nu doar cea octaedrică.

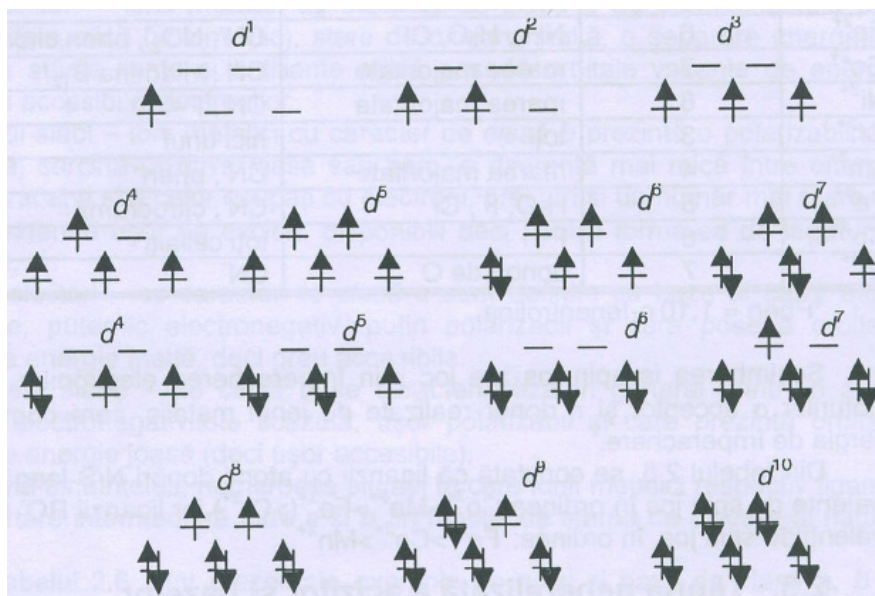


Figura 2-1. Variantele de ocupare a orbitalilor d în sistem de coordinare octaedric.<sup>6</sup>

Tabelul 2-2 ilustrează pentru câteva cazuri reprezentative măsura în care preferința pentru spin înalt sau spin jos depinde de natura ligandului, de starea de oxidare a acestuia (vezi în special cazul Co), respectiv de metal.

În principiu, unele sisteme chimice mai complexe pot conține electroni neîmperecheați în mai mult decât o locație. Spre exemplu, o moleculă organică poate conține două unități radicalice – și se va numi „biradical”. Mai de interes pentru subiectul acestui text, întâlnim centri di- sau multi-metalici, unde fiecare metal poate avea proprii electroni neîmperecheați. Dacă doi (sau mai mulți) centri paramagnetici dintr-o moleculă sunt relativ departe unul de celălalt, proprietățile lor magnetice nu se influențează reciproc (e ca și când ar fi în molecule diferite). Însă dacă aceștia sunt apropiați, atunci se vor comporta ca un tot unitar; numim această situație „cuplaj magnetic”. Avem două variante de astfel de cuplaj: (1) feromagnetic (când cei doi centri paramagnetici își aliniază câmpurile paralel unul cu celălalt, ceea ce înseamnă că sistemul se comportă ca un tot unitar al cărui număr de electroni neîmperecheați e egal cu suma electronilor neîmperecheați aduși de fiecare dintre cei doi centri), sau antiferomagnetic (când cei doi centri paramagnetici își aliniază câmpurile antiparalel unul cu celălalt, ceea ce înseamnă că sistemul se comportă ca un tot unitar al cărui număr de electroni neîmperecheați e egal cu diferența dintre numărul electronilor neîmperecheați aduși de un centru și cei aduși de celălalt centru). Luând cazul biradicalului definit mai sus, acesta se poate comporta în cele 3 scenarii fie ca (1) un amestec de doi radicali liberi ( $S=1/2$ , la distanță suficient de mare unul

de celălalt încât să nu se cupleze feromagnetic sau antiferomagnetic), (2) un sistem cu doi electroni neîmperecheați ( $S=1$ , cuplaj feromagnetic), sau (3) un sistem diamagnetic, cu un total de zero electroni neîmperecheați ( $S=0$ , cuplaj antiferomagnetic).

**Tabelul 2-2. Preferințe de spin în complecși anorganici comuni.<sup>6</sup>**

Cation	d	Liganzi care favorizează spin înalt	Liganzi care favorizează spin jos
Cr(III)	3	toți	niciunul
Mn(II)	5	marea majoritate	CN <sup>-</sup>
Mn(III)	4	marea majoritate	fenantrolina, CN <sup>-</sup>
Fe(II)	6	NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O, Cl <sup>-</sup>	fenantrolina, porfirine, CN <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Fe(III)	5	H <sub>2</sub> O, F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup>	porfirine, CN <sup>-</sup>
Co(II)	7	marea majoritate	corina (în vitamina B <sub>12</sub> ), CN <sup>-</sup>
Co(III)	6	F <sup>-</sup>	toți ceilalți
Ni(II)	8	marea majoritate	corfina (în coenzima F <sub>430</sub> ), CN <sup>-</sup>
Ni(III)	7	donori de O	CN <sup>-</sup>

Noțiunile legate de magnetism discutate mai sus au fost prezentate din punct de vedere molecular, la nivel micro. Pentru știința materialelor, sau în general la nivel macro, se poate nota că și materialele diamagnetice au un grad de interacțiune (fie el foarte slab) cu câmpul magnetic, din cauza efectelor induse de câmpul magnetic asupra sarcinilor în mișcare ale electronilor – fie ei și neîmperecheați. Multe dintre materialele comun cunoscute/discutate cu proprietăți magnetice (ex., fierul metalic) își datorează acele proprietăți electronilor de bandă din structura metalică mai degrabă decât unor electroni localizați într-un anumit orbital pe un anumit atom. În materiale la scală macro se definește suplimentar și feromagnetismul – ca acea situație unde atomii/moleculele în stare solidă/cristalină sunt orientați antiferomagnetic între ei, dar structura cristalină obligă una dintre orientări să fie dominantă.

### 2.1.2. Abundența naturală și în organismele vii

Abundența relativă a elementelor chimice din scoarța terestră decide în mare măsură ce elemente sunt disponibile pentru organismele vii. Tabelul 2-3 arată că printre cele mai abundente elemente se numără O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg.

**Tabelul 2-3. Cele mai abundente elemente chimice în scoarța terestră, cf. CRC Handbook.<sup>7</sup>**

#	Z	Simbol/nume	Fracție (kg/kg)	#	Z	Simbol/nume	Fracție (kg/kg)
1	08	O oxigen	$4.61 \times 10^{-1}$	9	22	Ti titan	$5.65 \times 10^{-3}$
2	14	Si siliciu	$2.82 \times 10^{-1}$	10	01	H hidrogen	$1.40 \times 10^{-3}$
3	13	Al aluminiu	$8.23 \times 10^{-2}$	11	15	P fosfor	$1.05 \times 10^{-3}$
4	26	Fe fier	$5.63 \times 10^{-2}$	12	25	Mn mangan	$9.50 \times 10^{-4}$
5	20	Ca calciu	$4.15 \times 10^{-2}$	13	09	F fluor	$5.85 \times 10^{-4}$
6	11	Na sodiu	$2.36 \times 10^{-2}$	14	56	Ba bariu	$4.25 \times 10^{-4}$
7	12	Mg magneziu	$2.33 \times 10^{-2}$	15	38	Sr stronțiu	$3.70 \times 10^{-4}$
8	19	K potasiu	$2.09 \times 10^{-2}$	16	16	S sulf	$3.50 \times 10^{-4}$

#	Z	Simbol/nume	Fracție (kg/kg)
17	06	C carbon	$2.00 \times 10^{-4}$
18	40	Zr zirconiu	$1.65 \times 10^{-4}$
19	17	Cl clor	$1.45 \times 10^{-4}$
20	23	V vanadiu	$1.20 \times 10^{-4}$
21	24	Cr crom	$1.02 \times 10^{-4}$
22	37	Rb rubidiu	$9.0 \times 10^{-5}$
23	28	Ni nichel	$8.4 \times 10^{-5}$
24	30	Zn zinc	$7.0 \times 10^{-5}$
25	58	Ce ceriu	$6.65 \times 10^{-5}$
26	29	Cu cupru	$6.0 \times 10^{-5}$
27	60	Nd neodim	$4.15 \times 10^{-5}$
28	57	La lantan	$3.9 \times 10^{-5}$
29	39	Y ytriu	$3.3 \times 10^{-5}$
30	27	Co cobalt	$2.5 \times 10^{-5}$
31	21	Sc scandiu	$2.2 \times 10^{-5}$
32	03	Li litiu	$2.0 \times 10^{-5}$
33	41	Nb niobiu	$2.0 \times 10^{-5}$
34	07	N azot	$1.9 \times 10^{-5}$
35	31	Ga galiu	$1.9 \times 10^{-5}$
36	82	Pb plumb	$1.4 \times 10^{-5}$
37	05	B bor	$1.0 \times 10^{-5}$
38	90	Th toriu	$9.6 \times 10^{-6}$
39	59	Pr praseodim	$9.2 \times 10^{-6}$
40	62	Sm samariu	$7.05 \times 10^{-6}$
41	64	Gd gadoliniu	$6.2 \times 10^{-6}$
42	66	Dy disprosiu	$5.2 \times 10^{-6}$
43	18	Ar argon	$3.5 \times 10^{-6}$
44	68	Er erbiu	$3.5 \times 10^{-6}$
45	70	Yb yterbiu	$3.2 \times 10^{-6}$
46	55	Cs cesiu	$3 \times 10^{-6}$

#	Z	Simbol/nume	Fracție (kg/kg)
47	72	Hf hafniu	$3.0 \times 10^{-6}$
48	04	Be beriliu	$2.8 \times 10^{-6}$
49	92	U uraniu	$2.7 \times 10^{-6}$
50	35	Br brom	$2.4 \times 10^{-6}$
51	50	Sn staniu	$2.3 \times 10^{-6}$
52	63	Eu europiu	$2.0 \times 10^{-6}$
53	73	Ta tantal	$2.0 \times 10^{-6}$
54	33	As arsen	$1.8 \times 10^{-6}$
55	32	Ge germanium	$1.5 \times 10^{-6}$
56	67	Ho holmiu	$1.3 \times 10^{-6}$
57	74	W wolfram	$1.25 \times 10^{-6}$
58	42	Mo molibden	$1.2 \times 10^{-6}$
59	65	Tb terbiu	$1.2 \times 10^{-6}$
60	81	Tl taliiu	$8.5 \times 10^{-7}$
61	71	Lu lutețiu	$8 \times 10^{-7}$
62	69	Tm tuliiu	$5.2 \times 10^{-7}$
63	53	I iod	$4.5 \times 10^{-7}$
64	49	In indiu	$2.5 \times 10^{-7}$
65	51	Sb stibiu	$2 \times 10^{-7}$
66	48	Cd cadmiu	$1.5 \times 10^{-7}$
67	80	Hg mercur	$8.5 \times 10^{-8}$
68	47	Ag argint	$7.5 \times 10^{-8}$
69	34	Se seleniu	$5 \times 10^{-8}$
70	46	Pd paladiu	$1.5 \times 10^{-8}$
71	83	Bi bismut	$8.5 \times 10^{-9}$
72	02	He heliu	$8 \times 10^{-9}$
73	10	Ne neon	$5 \times 10^{-9}$
74	78	Pt platină	$5 \times 10^{-9}$
75	79	Au aur	$4 \times 10^{-9}$

Elementele metalice, la fel ca majoritatea celorlalte, se găsesc în scoarță sub formă ionică, în combinații chimice. Pentru a fi accesibile organismelor vii, elementele chimice trebuie să fie dispuse să își schimbe liganzii – în special să accepte apa ca ligand, astfel încât să poată ajunge în apele de suprafață și de acolo în celulele vii. Se folosesc termenii de „labil cinetic”, respectiv „inert cinetic” pentru a descrie disponibilitatea metalelor de a-și înlocui liganzii. Labilitatea cinetică a metalelor depinde:

- (1) invers proporțional de sarcina electrică (valoarea totală, dar și raportul sarcină/rază; astfel, metalele din blocul s, cu sarcină +1 sau +2, sunt labile cinetic – dar Mg este ceva mai inert din cauza volumului mai mic la aceeași sarcină pozitivă; Fe(III) este mai labil cinetic decât Fe(II))

- (2) direct proporțional de numărul de electroni neîmperecheați (spre exemplu Fe(II) de spin înalt, care are 4 electroni neîmperecheați, este mai labil cinetic decât Fe(II) de spin jos, care are zero electroni neîmperecheați; dar de asemenea în general elementele cu strat complet – precum  $d^{10}$ , spre exemplu zincul, sau cele  $d^3$  sau  $d^6$  de spin jos precum Cr(III), Co(III), Fe(II)). Având în vedere considerentele de mai sus, putem examina abundența relativă a elementelor chimice în apa de ocean – cea în care este general acceptat că s-au dezvoltat multă vreme primele forme de viață de pe planeta noastră – prezentată în Tabelul 2-4.

**Tabelul 2-4. Cele mai abundente elemente chimice în apa de ocean, cf. CRC Handbook.<sup>7</sup>**

#	Z	Simbol/nume	kg/L	#	Z	Simbol/nume	kg/L
1	08	O oxigen	$8.57 \times 10^{-1}$	23	42	Mo molibden	$1 \times 10^{-8}$
2	01	H hidrogen	$1.08 \times 10^{-1}$	24	30	Zn zinc	$4.9 \times 10^{-9}$
3	17	Cl clor	$1.94 \times 10^{-2}$	25	33	As arsen	$3.7 \times 10^{-9}$
4	11	Na sodiu	$1.08 \times 10^{-2}$	26	92	U uraniu	$3.2 \times 10^{-9}$
5	12	Mg magneziu	$1.29 \times 10^{-3}$	27	23	V vanadiu	$2.5 \times 10^{-9}$
6	16	S sulf	$9.05 \times 10^{-4}$	28	13	Al aluminiu	$2 \times 10^{-9}$
7	20	Ca calciu	$4.12 \times 10^{-4}$	29	26	Fe fier	$2 \times 10^{-9}$
8	19	K potasiu	$3.99 \times 10^{-4}$	30	22	Ti titan	$1 \times 10^{-9}$
9	35	Br brom	$6.73 \times 10^{-5}$	31	28	Ni nichel	$5.6 \times 10^{-10}$
10	06	C carbon	$2.8 \times 10^{-5}$	32	24	Cr crom	$3 \times 10^{-10}$
11	38	Sr stronțiu	$7.9 \times 10^{-6}$	33	55	Cs cesiu	$3 \times 10^{-10}$
12	05	B bor	$4.44 \times 10^{-6}$	34	29	Cu cupru	$2.5 \times 10^{-10}$
13	14	Si siliciu	$2.2 \times 10^{-6}$	35	51	Sb stibiu	$2.4 \times 10^{-10}$
14	09	F fluor	$1.3 \times 10^{-6}$	36	36	Kr kripton	$2.1 \times 10^{-10}$
15	07	N azot	$5 \times 10^{-7}$	37	25	Mn mangan	$2 \times 10^{-10}$
16	18	Ar argon	$4.5 \times 10^{-7}$	38	34	Se seleniu	$2 \times 10^{-10}$
17	03	Li litiu	$1.8 \times 10^{-7}$	39	10	Ne neon	$1.2 \times 10^{-10}$
18	37	Rb rubidiu	$1.2 \times 10^{-7}$	40	48	Cd cadmiu	$1.1 \times 10^{-10}$
19	15	P fosfor	$6 \times 10^{-8}$	41	74	W tungsten	$1 \times 10^{-10}$
20	53	I iod	$6 \times 10^{-8}$	42	32	Ge germaniu	$5 \times 10^{-11}$
21	49	In indiu	$2 \times 10^{-8}$	43	54	Xe xenon	$5 \times 10^{-11}$
22	56	Ba bariu	$1.3 \times 10^{-8}$	44	47	Ag argint	$4 \times 10^{-11}$

Metale mai grele (precum plumbul, mercurul) sunt în general moi în sens HSAB. În parte de aceea, ele tind să fie mai puțin prezente în apele de suprafață (apa fiind un ligand nepotrivit pentru centrul moi), ceea ce face ca mai departe ele să nu fi fost general recrutate de organismele vii pentru funcții fiziologice. Complementar sau consecutiv acestei alegeri, atunci când astfel de centri moi ajung în organismele vii, ei tind să interfereze cu funcționarea biomoleculelor (și astfel să fie toxici) – în special la nivelul biomoleculelor care conțin liganzi moi, în primul rând cei cu sulf. Din contră, metalele mai dure (și în special sodiul, potasiul








sau calciul) vor fi dizolvate mai ușor în apă și de aceea vor fi mai disponibile organismelor vii. În fapt, mai mulți centri duri sunt esențiali vieții ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Elementele necesare organismelor vii se clasifică în cele specifice chimiei organice (H, C, N și O), alături de care găsim și macro-mineralele esențiale (Na, K, Mg, Ca, Cl, P și S; "macro-mineral" înseamnă că este esențial în cantități relativ mari organismului), iar pe urmă oligomineralele: Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Co, Mo („oligomineral” se referă la faptul că este esențial în cantități foarte mici organismului). Tabelul 2-5 prezintă sintetic elementele cu funcții demonstrate sau presupuse în diversele organisme vii.

**Tabelul 2-5. Elemente nutriționale în tabelul periodic.<sup>8</sup>**

H																	He	
Li	Be									B	C	N	O	F	Ne			
Na	Mg									Al	Si	P	S	Cl	Ar			
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	*	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	**	Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts	Og
			*	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	
			**	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	

**Legenda:**

-  Cele patru elemente organice de bază – macroelemente, esențiale tuturor organismelor
-  Macroelemente, esențiale tuturor organismelor
-  Oligoelemente esențiale
-  Considerat oligoelement esențial de către autoritățile SUA, dar nu și de către Uniunea Europeană
-  Funcție sugerată de efectele privării sau manipularea metabolică, dar încă nedovedită clar la om
-  Dovezi circumstanțiale limitate pentru beneficiile urmelor sau acțiunea biologică la mamifere
-  Nu există dovezi pentru acțiunea biologică la mamifere, dar esențială în unele organisme inferioare. (În cazul lantanului, definiția unui nutrient esențial ca fiind indispensabil și de neînlocuit nu este complet aplicabilă din cauza asemănării extreme a lantanidelor. Lantanidele timpurii stabile până la Sm sunt cunoscute a stimula creșterea diferitelor organisme care utilizează lantanide.)

## 2.2. Purificarea și analiza compușilor metalici din organismele vii

Partea centrală a chimiei bioanorganice se referă la metalocomplecșii din organismele vii – adică în general complecșii cu biomolecule cheie (proteine, acizi nucleici, glucide, lipide, vitamine, metaboliți și alte molecule mici). Izolarea unor astfel de complecși se face după aceleași reguli ca în restul chimiei organice sau biochimiei, cu unele măsuri mai speciale pentru conservarea și/sau detectarea centrului metalic. Diferențele cele mai notabile față de procedurile standard biochimice/organice, dar și cazurile cele mai dese de studii de metalocomplecși biologici, se referă la metaloproteine și metalopeptide – motiv pentru care în cele ce urmează ne vom concentra în special pe aceste clase.



### 2.2.1. Din sursa originală

Cea mai relevantă formă a unei metaloproteine este cea extrasă direct din sursa/organismul în care acea metaloproteină funcționează în mod normal. Se folosește pentru această versiune de proteină termenul „nativă”. Totuși, această variantă este în general incomodă, întrucât în celulele vii fiecare proteină se află în concentrații extrem de mici, ceea ce înseamnă că procedura de purificare va necesita cantități relativ mari de materie primă și metode foarte sensibile de detectare a proteinei de interes dintre toate celelalte.<sup>9</sup> Excepții sunt unele probe care pot într-adevăr să abunde într-o singură proteină; cea mai notabilă este sângele – unde 40% din volum e constituit de celule roșii, iar 30% din conținutul acestora este reprezentat de hemoglobină. Din doar câțiva mL de sânge se poate obține suficientă hemoglobină pentru o gamă largă de experimente.<sup>10</sup> În schimb, pentru izolarea unei proteine oarecare bacteriene în cantitate suficientă pentru experimente la scală de laborator, se recurge la fermentații în bioreactoare de capacitate mare (până la 100 de litri de cultură/șarjă).<sup>11</sup>

### 2.2.2. Prin metode recombinante

Atunci când se cunoaște secvența de ADN care codifică proteina de interes, este azi o procedură de rutină ca acea genă să fie clonată/copiată și inserată într-un organism gazdă ușor de cultivat în laborator – un organism care astfel devine modificat genetic, sau transgenic. Proteina astfel obținută se numește „recombinată” (sau recombinantă). Procedura este oportună din două puncte de vedere:

- (1) odată cu gena de interes nou introdusă se ~~adaugă~~ inserează și gene care conferă rezistență la antibiotice a celulelor gazdă modificate genetic, asigurând cultivarea selectivă a lor, împiedicând contaminarea culturilor celulare cu alte microorganisme, dar și gene care determină organismul să producă proteina de interes în cantitate foarte mare în raport cu proteinele proprii (procedeul se numește supraexprimarea proteinei de interes);
- (2) se pot astfel cultiva proteine care altfel (în formă nativă) ar proveni din organisme greu de manipulat/folosit direct – spre exemplu proteine umane, sau proteine care provin din microorganisme periculoase/patogene, sau din organisme care necesită condiții prea dificile de lucru.<sup>11-17</sup>

Toate clasele de organisme pot fi adaptate pentru a servi la supraexprimarea unei proteine prin metode recombinante: bacterii, fungi (inclusiv drojdii), plante, insecte, animale. Procedura standard este de a folosi bacterii, pentru că rata lor de multiplicare (diviziunea celulară) este foarte mare în comparație cu celelalte tipuri de celule și pot fi cultivate în orice volum în funcție de necesități. Dintre bacterii, *Escherichia coli* (*E. coli*) este opțiunea standard; se folosesc în general linii celulare standard, disponibile comercial, care sunt modificate/selectate genetic astfel încât să (1) nu fie patogene și (2) să accepte ușor materialul genetic recombinant introdus artificial.

Totuși, unele proteine provenite din organisme superioare (eucariote) nu pot fi exprimate în bacterii (procariote) – cel puțin nu într-o formă identică cu cea nativă. Spre exemplu, proteinele eucariote pot include la suprafață unități glucidice, pe care procariotele nu le pot produce. De asemenea, unele proteine eucariote conțin situsuri active speciale, pe care bacteriile nu le pot produce sau le produc cu randament prea mic. În astfel de cazuri se recurge de obicei la culturi de fungi sau de plante – însă acestea sunt mai pretențioase la condițiile/procedurile

de cultivare și sunt mai lente în creștere; nu în ultimul rând, randamentele pentru proteina recombinată tind să fie mai mici decât în bacterii.<sup>18,19</sup>

### 2.2.3. Cultivarea

Condițiile speciale și specifice cultivării organismelor (recombinante sau native) sunt esențiale în vederea obținerii metaloproteinelor în formă activă (nealterate) cu includerea corespunzătoare a situsului metalic în proteină.

Un astfel de parametru este temperatura. Deși cultivarea optimă a celulelor *E. coli* decurge la 37°C, atunci când sunt folosite pentru exprimarea metaloproteinelor cu situsuri metalice mai complicate (precum hemul din hemoglobină) se impune reducerea temperaturii de fermentație sub 30°C în vederea armonizării vitezelor de formare a componentei proteice cu cea a biosintezei situsului metalic.<sup>20</sup>

Un alt parametru important este compoziția mediului de cultură. Pentru proceduri standard se folosesc așa-numitele medii complete – care conțin toți nutrienții necesari creșterii rapide a organismului cultivat. În cazuri speciale se recurge la folosirea mediilor de cultură limitative, care conțin doar componentele strict necesare fermentației. De exemplu, un mediu limitativ care conține strict doar câțiva ioni esențiali precum  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , fosfat, alături de o sursă simplă de carbon precum glucoza va fi utilizat atunci când se fermentează o metaloproteină la al cărui situs activ se dorește inserția un anumit metal în locul celui natural. În astfel de condiții constrânse celula va fi determinată să producă de exemplu o variantă de metaloenzimă cu zinc deși varianta naturală a proteinei posedă un situs activ cu fier, sau *viceversa*. Controlul compoziției în metale a mediului de cultură este cu atât mai important cu cât unele proteine prezintă o oarecare promiscuitate în legarea metalului, în special dacă nu sunt produse în organismul nativ. Astfel, o proteină care în organismul nativ conține Mn la situsul activ ar putea ca în forma recombinată din *E. coli* să prezinte diverse forme – unele cu mangan, altele cu alte metale similare ca volum dar mai abundente în mediul de cultură (ex. fier, zinc). Mai mult, dacă mediul de cultură este prea bogat în oligominerale, unele dintre acestea, pe lângă ionul din situsul metalic, se pot atașa aleatoriu și nespecific la proteină.<sup>11,12,14,15,21,22</sup>

Mai rar, alți factori cum ar fi cel fotochimic (alterarea culturii expuse la lumină sau din contră, necesitatea expunerii la lumină – precum cele de plante) sau cel atmosferic (fie excluderea unui component – cum ar fi oxigenului în cazul fermentațiilor anaerobe – fie îmbogățirea atmosferei cu un component, de exemplu cu monoxid de carbon pentru exprimarea corespunzătoare, mai apoi stabilizarea prin inhibarea degradării unor metaloproteine sensibile structural).

### 2.2.4. Izolarea proteinei de interes

În majoritatea cazurilor, proteina de interes se acumulează intracelular, mai rar proteina produsă în celulă se externalizează și se acumulează în spațiul extracelular. În ambele cazuri procedura de izolare și purificare a proteinelor va începe prin separarea (de obicei prin centrifugare) a celulelor de supernatant / din mediul de cultură. Datorită diversității proteice scăzute dar și a conținutului redus în alte macromolecule a mediului extracelular, izolarea și apoi purificarea proteinelor extracelulare decurge relativ ușor, cum ar fi în cazul proteinelor din serul sanguin, precum ceruloplasmina sau albumina.<sup>23,24</sup>

Pentru separarea proteinelor intracelulare, se impune spargerea membranei celulare (și a peretelui celular, dacă există), procedeu numit și „liza celulară”. Rar, în cazul celulelor foarte fragile precum eritrocitele din sânge, ruperea membranelor se poate realiza și osmotic prin simpla suspendare a acestora în apă distilată. Datorită diferenței de concentrație de săruri a mediului intra- și extracelular se generează o presiune osmotică ce va facilita transportul de apă înspre interiorul celulelor, provocând mărirea volumului acestora până la dezintegrarea structurală a membranei.<sup>16</sup> O altă modalitate pentru liza celulară poate fi folosirea de agenți chimici: spre exemplu, detergenți, sau utilizarea enzimelor specializate pentru degradarea peretelui celular. În laborator cel mai des utilizate sunt metodele fizice care provoacă creșterea sau pulsația de volum a celulelor, facilitând dezintegrarea acestora. Sunt de menționat metoda înghețării repetitive (îngheț-dezgheț), fie cea a depresurizării rapide a celulelor presurizate în prealabil (presa franceză). Astfel suspensia celulară din cilindru este presurizată treptat acționând asupra pistonului, urmată de o perioadă de repaus, în vederea acomodării celulelor la mediul de presiune înaltă și în final suspensia presurizată este evacuată prin ejector într-un vas colector. Trecerea rapidă a celulelor din mediul presurizat în cel de presiune atmosferică va conduce la dezintegrare membranei (peretelui) celular prin explozie. Cel mai frecvent se utilizează tratamentul cu ultrasunete (ultrasonare, sau sonicare) care provoacă liza celulară prin cavitație.

În vederea eficientizării procesului de izolare se pot folosi ocazional și adjuvanți. Spre exemplu, inhibitorii proteazelor limitează gradul de hidroliză a proteinelor. De asemenea, se pot utiliza ADNaze – enzime care fragmentează materialul genetic al celulelor, astfel evitându-se interferența ADN-ului cu proteinele în cursul procesului de purificare.

După distrugerea membranelor/peretilor, se recurge de obicei la o etapă de centrifugare, pentru separarea supernatantului (fracției solubile) de resturile insolubile. De regulă proteina de interes este localizată în fracția lichidă. Există însă și două situații în care proteina se află într-o matrice insolubilă. Astfel, proteinele membranare vor fi solubilizate ulterior fracționării prin adăugare de detergent. Apoi, există situații, de regulă întâlnite în cazul unor proteine recombinante, când celula gazdă nu posedă echipamentul necesar plierii (foldării) corespunzătoare a lanțului proteic proaspăt biosintetizat (în vederea adoptării structurii secundare/terțiare/cuaternare potrivite). În astfel de cazuri se poate produce agregarea proteică ce va conduce la precipitarea lor sub forma unor așa numite corpuri de incluziune. Resolubilizarea proteinelor se poate efectua cu ajutorul agenților chaotropici, precum guanidina în concentrație mare, care resolubilizează proteinele agregate, privându-le de adoptarea formelor de foldare specifice structurilor secundare/terțiare/cuaternare. Apoi, prin reducerea treptată și lentă a concentrației de guanidină (diluare, dializă, filtrare) proteina s-ar putea împacheta și adopta o formă cât mai apropiată de cea nativă, evitându-se precipitarea acesteia.

### 2.2.5. Metode de purificare

Proteinele din supernatant pot fi supuse unor proceduri de precipitare cu agenți precum solvenții organici sau, cel mai des, cu săruri ultra-concentrate (dintre care pe departe cea mai comun folosită este sulfatul de amoniu). În principiu procedura se poate realiza în trepte prin creșterea graduală a concentrației agentului de precipitare („fracționare”). astfel încât la o primă etapă, cu o concentrație mai mică de agent de precipitare, În funcție de solubilitatea componentelor

proteice a soluției se va produce o precipitare fracționată a acestora în determinată de concentrația agentului de precipitare. În timp ce componentele cele mai puțin solubile vor precipita deja la concentrații reduse de sulfat de amoniu, proteinele cele mai solubile vor precipita numai în soluții de săruri saturate. Frația de precipitat care conține proteina de interes, se resolubilizează și la final, agentul de precipitare este îndepărtat prin diluare/dizolvare în soluție tampon urmată de filtrare sau dializă. Metodele acestea sunt denumite generic „grosiere” și rămân opționale. Ele produc foarte rar proteină suficient de pură pentru studii biochimice detaliate. De aceea sunt urmate de obicei de metode cromatografice de separare (numite generic și „metode fine de separare a proteinelor”).

Metodele cromatografice sunt prefațate și urmate de obicei de etape de eliminare a componentelor de masă moleculară mică și de modificare a soluției tampon astfel încât să fie compatibilă cu tipul de coloană folosită. Spre exemplu, pentru cromatografia de schimb ionic soluția tampon trebuie să fie cât mai săracă în săruri anorganice, pentru ca ele să nu interfereze cu legarea proteinei la faza staționară a coloanei. Din contră, la cromatografia de excluziune sterică (gelfiltrare) soluția tampon trebuie să fie bogată în ioni anorganici, pentru că principiul de separare impune ca proteina să nu adere deloc la coloană. Aceste modificări ale soluției tampon se fac prin diluări și reconcentrări repetate sau prin dializă, folosind membrane cu pori relativ mari care să permită migrarea componentelor de masă moleculară mică.

Metodele cromatografice folosite pentru separarea proteinelor funcționează după principii similare cu cele dezvoltate pentru separarea moleculelor mici. Cu toate acestea în cazuri rare, se pot folosi aceleași proceduri pentru separarea ambele clase de compuși (proteine / moleculele organice mici). Cu alte cuvinte, un HPLC cu coloane aferente funcționează în condiții prea dure, iar fazele mobile uzuale sunt denaturante pentru proteine. Menținerea proteinei în formă nativă/solubilă, a impus dezvoltarea cromatografiei specifică separatologiei proteice în condiții blânde. Corpul coloanelor e confecționat din material nemetalic, fazele staționare din coloane sunt fabricate din materiale biocompatibile iar eluenții sunt soluții tampon și nu pot conține componente cu caracter denaturant (solvenți organici, etc.). Cromatograful abreviat FPLC (fast protein liquid chromatograph) este asemănător HPLC-ului, iar detectorul UV-vis folosit în general este setat la detectarea absorbției în ultraviolet la 280 nm, specifică proteinelor. Unele metaloproteine sunt colorate, ceea ce permite detectarea lor selectivă în domeniul vizibil.

În succesiunea metodelor FPLC folosită pentru purificarea avansată a proteinei țintă dintr-un lizat celular brut cu vâscozitate redusă sau medie de obicei prima este cromatografia de schimb ionic. În cazul soluțiilor cu vâscozitate ridicată, pentru evitarea presurizării excesive a fazei staționare se renunță la folosirea aparatului FPLC și se optează pentru cromatografia gravitațională. Sunt disponibile comercial o gamă largă de coloane de schimbători de anioni sau de cationi de diverse tării. Un avantaj al acestei cromatografii (și un motiv pentru care ea este prima folosită la prelucrarea lizatului brut) este că volumul probei este irelevant atâta vreme cât coloana nu este saturată cu proteine; astfel, nu este neapărat necesar ca proba (lizatul brut) să fie în prealabil concentrată/prelucrată.

Pentru separarea amestecurilor proteice cu conținut relativ ridicat în proteina țintă se folosește cromatografia de excluziune sterică (gel-filtrarea), care separă componentele exclusiv în funcție de volumul / masa moleculară a acestora. De aceea este esențial ca proba să aibă volum mic (implicit, să fie cât mai concentrată), iar viteza de migrare a speciilor pe coloană este proporțională cu volumele moleculare ale proteinelor.

În cazuri speciale, se recurge și la cromatografia de afinitate. Există două clase de cromatografie de afinitate. Prima clasă se bazează pe recunoașterea anticorp-antigen, faza staționară a coloanei fiind derivatizată cu anticorpii proteinei țintă. Astfel faza staționară va mări timpul de retenție pe coloană doar proteinei de interes, celelalte eluându-se nerestricționat. A doua clasă este aplicabilă proteinelor recombinante –și constă în adăugarea la gena proteinei a unui rest de ADN ce codifică o secvență specială de aminoacizi. Această secvență este aleasă astfel încât să prezinte afinitate remarcabilă față de un motiv molecular atașat de faza staționară a coloanei cromatografice. Spre exemplu, proteinei i se poate adăuga o secvență de 6-9 histidine (în general la capătul *N*-terminal al proteinei). Această etichetă histidinică („His-tag”)– prin atomii săi de azot va lega selectiv proteina de faza staționare decorată cu ioni metalici (cobalt sau nichel). O altă opțiune este adăugarea unui întreg domeniu suplimentar la gena proteinei de interes – un domeniu care să permită legarea de coloana de cromatografie; un exemplu ar fi folosirea genei/domeniului pentru proteina de legare a maltozei (maltose-binding protein), cuplată cu o coloană de afinitate pe care se află fixată maltoză. După purificare etichetele mai sus menționate pot fi eliminate sub acțiunea unor proteaze.

Electroforeza în diverse variante este indispensabilă pentru analizarea (și, dacă sunt urmărite cantități foarte mici, purificarea) proteinelor. În aceste metode proteinele migrează printr-un strat planar sau o minicoloană de gel, sub influența unui câmp electric – dacă aminoacizii de la suprafața lor le asigură o sarcină totală electrică diferită de zero. Opțiunea cea mai folosită este SDS-PAGE (electroforeza în gel de poliacrilamidă folosind un agent denaturant, detergentul lauril sulfat de sodiu = dodecil sulfat de sodiu, SDS). În această metodă detergentul nu doar că denaturează proteina ci se și atașează prin partea sa hidrofobă de aminoacizii proteinei, expunând către exterior gruparea sulfat și dând astfel ansamblului o sarcină electrică direct proporțională cu numărul de aminoacizi, deci cu masa proteinei. Prin urmare, SDS-PAGE separă proteina în funcție de masa moleculară. O altă opțiune este electroforeza PAGE nativă (în absența detergentului), unde proteina rămâne ne-denaturată iar separarea se face în funcție de abilitatea proteinei de migra prin gel (controlată de masa moleculară) și de sarcina totală electrică a proteinei (dependentă de natura aminoacizilor aflați la suprafața ei).

Toate metodele descrise mai sus pot fi folosite atât în scop de separare, cât și în scop analitic – de determinare a masei moleculare, punctului izoelectric sau a altor caracteristici.

## 2.2.6. Analiza elementală

Pentru metaloproteine, în special în etapa inițială de caracterizare, analiza elementală este esențială. Analiza se face după principii și cu aparate similare cu cele folosite în restul chimiei – dar în acest caz ținta nu este atât conținutul de elemente tipice părții organice (carbon, oxigen, azot, sulf) cât conținutul de elemente mai rare – și în special metalele. Raportându-ne la masa moleculară (care a fost evaluată prin metode precum cele descrise în secțiunea anterioară), vom putea vedea ce metal(e) se află în proteină. Într-o ipoteză optimistă, în care purificarea a fost făcută foarte bine și situsul metalic este robust, analiza elementală ne va spune ce metal(e) folosește proteina la centrul ei activ. Adesea însă situsurile active pot fi instabile sau promiscue, astfel încât în proteina purificată ele pot să fie doar parțial ocupate cu metalul care s-ar găsi acolo în proteina intactă în organismul original, sau, și mai rău, să conțină (și) alte metale decât cel original. De asemenea, o proteină incomplet purificată poate purta la suprafață și ioni

metalici legați nespecific. Toate aceste scenarii trebuie luate în considerare și verificate înainte ca metaloproteina să fie supusă la măsurători complexe de reactivitate și spectroscopice, care altfel ar fi afectate în moduri greu de anticipat/interpretat.

### **2.2.7. Crearea de metaloproteine artificiale**

Odată cu dezvoltarea tehnicilor de inginerie genetică și de sinteză chimică selectivă, a devenit posibil să creăm și metaloproteine artificiale – începând cu simple modificări punctuale de aminoacizi prin modificarea genei (mutageneză direcționată la sit, dar și mutageneză aleatoare) sau prin modificare chimică selectivă, dar continuând mai recent cu generarea de proteine complet artificiale, cu secvențe decise de la zero de către cercetători. Astfel de proceduri pot ajuta la înțelegerea modului de funcționare a unei metaloproteine, la modificarea proprietăților ei chimice sau de stabilitate, ori în general a principiilor care le guvernează structura și funcția, dar și la crearea de proteine cu conținut și/sau cu funcții complet fără precedent în lumea biologică.

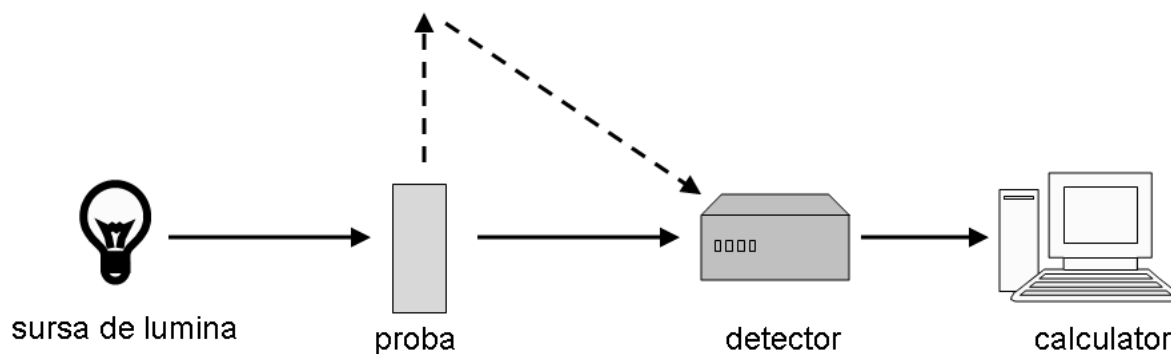
## **2.3. Compuși sintetici, compuși model**

Chimia clasică anorganică / coordinativă / organometalică sintetică poate contribui la domeniul bioanorganic în principal pe două căi. În prima variantă, o gamă largă de compuși sintetici poate fi explorată din punct de vedere al efectului asupra organismelor vii – fie pentru a înțelege elemente de toxicitate, fie pentru a dezvolta agenți cu uz de terapie sau diagnostic. În a doua variantă, sinteziștii pot dezvolta molecule care seamănă cu situsurile metalice biologice, pentru a ajuta la înțelegerea modului în care acele situsuri funcționează. În această din urmă situație, compușii astfel sintetizați se numesc „compuși model”, pentru că ei alcătuiesc modele mai simple de studiat/purificat/analizat decât situsul metalic propriu-zis. Pe lângă utilitatea de a înțelege astfel mai bine centrii biologici propriu-zise, compușii model pot oferi și oportunitatea generării de sisteme cu aplicații practice mai eficiente, mai robuste sau mai productive economic decât cele chimice clasice sau decât cele biologice. Deși nu va fi acoperită decât în trecere în textul de față, chimia sintetică cu relevanță bioanorganică este un domeniu extrem de activ și de larg. În fapt, compusul de sinteză cisplatina, discutat în Capitolul 15, este cel mai folosit medicament anticancer din lume – iar înțelegerea beneficiilor sale (și ale derivaților metalici similari) a contribuit semnificativ la acceptarea și dezvoltarea chimiei bioanorganice ca disciplină științifică.

## **2.4. Spectroscopia de absorbție electronică moleculară și metodele înrudite (UV-vis, CD, MCD, VT/VH-MCD, fluorescență)**

Principiul de funcționare al acestei clase de metode este probabil deja cunoscut celor care au urmat o specializare în domeniile chimie, fizicii sau biologiei. Îl reluăm aici pe scurt: este vorba de a trimite un fascicul de lumină din domeniul UV-vis-NIR (ultraviolet – vizibil infraroșu apropiat, ~200 nm – 1500 nm) prin proba de interes, măsurând în ce măsură proba absoarbe/modifică această lumină. Responsabili de aceasta absorbție sunt electronii din straturile de valență ale moleculelor din probă, care, absorbind lumina, sunt promovați pe orbitali de

energie superioară, anterior liberi. În cazul aparte al fluorescenței, ceea ce se măsoară nu este direct fasciculul trecut prin proba, ci, la un unghi de  $90^\circ$  cu acesta, lumina emisă de probă ca urmare a interacțiunii cu fasciculul incident. Figura 2-2 ilustrează schematic principiul de funcționare descris mai sus. După cum se discută în detaliu în altă parte, măsura în care proba absoarbe lumina este cuantificabilă în diverse moduri, dintre care absorbanta (descriind procentul de lumina absorbit de proba) este cel mai des utilizată, în timp ce transmitanța (descriind procentul de lumina care nu este absorbită de probă, principial invers proporțională cu absorbanta) este folosită relativ rar în experimentele curente din laboratorul bioanorganic.

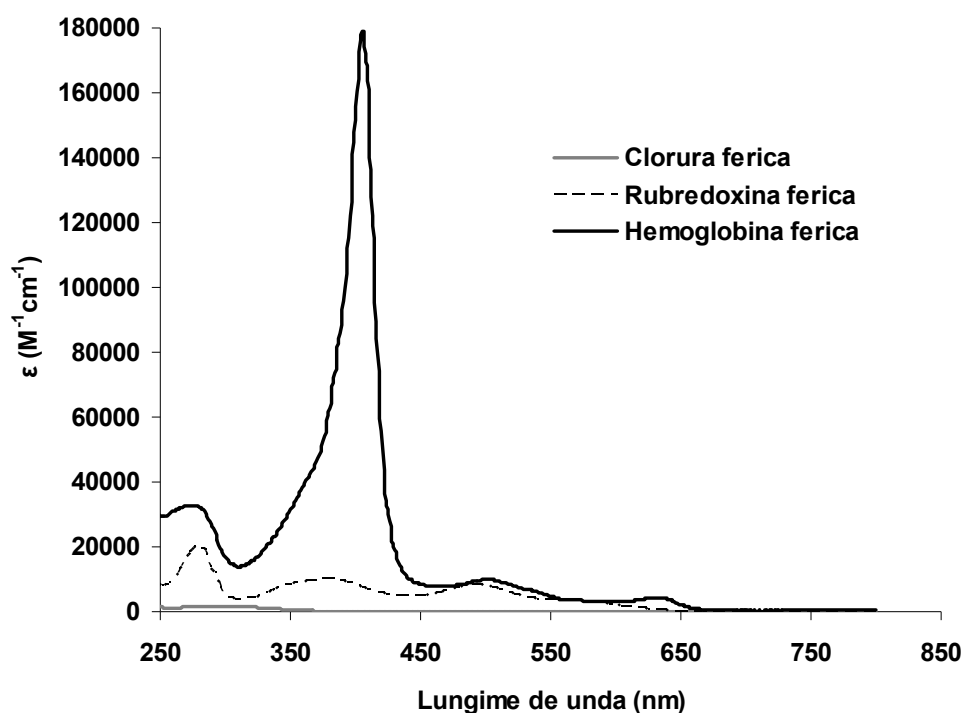


**Figura 2-2.** Schema de funcționare al spectroscopiilor de absorbanta electronică UV-vis; în cazul spectroscopiei de fluorescent detectorul se află la un unghi de  $90^\circ$  față de raza incidentă (linia punctată).

### 2.4.1. Spectroscopia UV-vis

Rezultatele unei măsurători tipice de spectroscopie de absorbție electronică folosind lumina din domeniul de energie 200 nm-800 nm (domeniul ultraviolet și vizibil, ceea ce face ca experimentul să fie denotat de obicei cu termenul de „spectru UV-vis”) sunt de obicei prezentate sub forma unui grafic absorbanta = funcție de energie, unde energia este exprimată în nanometri. Absorbanta la o lungime de undă dată se supune legii Lambert-Beer:  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ , unde  $b$  este lungimea drumului străbătut de lumina prin proba (de obicei 1 cm, măsurătoarea efectuându-se pe o probă lichidă în cuve de sticlă, cuarț sau plastic transparent cu lungimea interioară de 1 cm),  $c$  este concentrația molară a probei iar  $\epsilon$  este coeficientul de extincție sau absorbivitatea molară și se exprimă în  $M^{-1}cm^{-1}$  (astfel încât absorbanta este o mărime adimensională). Coeficientul  $\epsilon$  este o proprietate unică a substanței date pentru o anumită lungime de undă, iar valoarea sa reflectă, în mod predictibil, elemente de structură electronică ale respectivei substanțe. După cum am menționat mai sus, fotonul incident are posibilitatea de a fi absorbit de unul din electronii din stratul de valență al unei substanțe din probă; pentru ca acest fenomen de absorbție să aibă loc, este necesar ca energia fotonului să fie egală cu diferența de energie dintre orbitalul în care se află deja electronul și orbitalul unde acest electron va urca în urma absorbirii fotonului. Prin urmare, poziția și numărul benzilor (maximelor de absorbție) observabile în spectrul unui compus reflectă energiile relative ale orbitalilor de frontieră ai aceluia compus. Pe de altă parte, eficiența cu care un compus absoarbe lumina de o anumită energie este controlată, independent de energiile orbitalilor, de natura acestora. Aceasta eficiență este cea descrisă empiric de coeficientul de extincție  $\epsilon$ , și este determinată de structurile orbitalilor implicați în saltul electronic (tip de simetrie, grad de ocupare, grad de similaritate).

Astfel, printre cele mai slabe benzi ca intensitate (ordin de mărime al  $\epsilon$  de maximum câteva sute) observabile în chimia bioanorganică sunt cele caracteristice ionilor metalelor tranziționale, unde electronul suferă o tranziție de pe un orbital d pe alt orbital d. Pe de altă parte, atunci când electronul migrează de pe un orbital molecular localizat predominant pe un ligand către un orbital localizat predominant pe metal, saltul electronic reprezintă, formal, un fenomen de migrare de sarcină (transfer de sarcină de la ligand la metal, cu acronimul LMCT, de la „ligand to metal charge transfer” folosit în mod curent în lucrările de specialitate); în astfel de situații coeficienții de extincție ating de obicei valori de câteva mii. În același domeniu tind să se încadreze și coeficienții de extincție ai unor cofactori comuni, ca NAD(P) (nicotinamid adenin dinucleotida) sau FMN/FAD (flavin adenin mono/di-nucleotida), ceea ce face ca pentru mulți centri metalici urmărirea centrilor metalici cu ajutorul spectroscopiei UV-vis să fie problematică atunci când în amestecul de reacție mai sunt prezenți și alți cofactori. Nu de aceeași problemă suferă centrii metalici din clasa celor întâlniți în hemoglobina: aici, un sistem conjugat extins (porfirina, care coordonează central fierul, formând o așa-numită structură de tip hemic) are la dispoziție un număr mare de orbitali  $\pi$  și  $\pi^*$ , de simetrii compatibile, ceea ce dă naștere la benzi mergând în intensitate până la  $200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  – care sunt cele mai intense posibile într-un metalocomplex de relevanță biologică. Figura 2-3 ilustrează spectrele a trei clase de metalocomplecși, ilustrând diferențele de coeficient de extincție provocate de natura diferită a liganzilor prezenți la metal.



**Figura 2-3. Spectrele UV-vis ale unei grupări heminice, al unei proteine cu fier și sulf, și al clorurii de Fe(III), ilustrând (în această ordine) tranziții  $\pi \rightarrow \pi^*$  (cca 400 nm în spectrul hemoglobinei), LMCT (350-600 nm în spectrul rubredoxinei) și respectiv d-d (clorura ferica).**

Aparatele UV-vis sunt printre cele mai comune instrumente în chimia bioanorganică, necesitând cantități relativ mici de probă și având costuri mult mai mici decât ale celorlalte instrumente discutate în continuarea acestui capitol; mai mult, operarea lor este foarte simplă



și prin urmare nu necesită prezența permanentă a unui operator (sau operatori) specializat în această operație.

### 2.4.2. Spectroscopia de dicroism circular (CD)

Dacă proba are proprietăți chirale (ceea ce este cazul oricărei proteine chiar și în absența unui centru metalic), în cazul în care fasciculul incident este polarizat (unda luminoasă oscilează într-un plan bine definit, spre deosebire de lumina normală, în care fotonii dintr-un fascicul oscilează în planuri aflate la o înfinitate de unghiuri diferite unul față de celălalt), proba chirală va roti planul luminii polarizate. Spectrele CD profită de această proprietate; ele sunt folosite relativ rar în domeniul metaloproteinelor, de obicei ca o unealtă de investigare a părții proteice (de exemplu, conținutul relativ de structuri de tip  $\alpha$  sau  $\beta$ , sau gradul de denaturare); o ilustrare este dată în Figura 2-4.

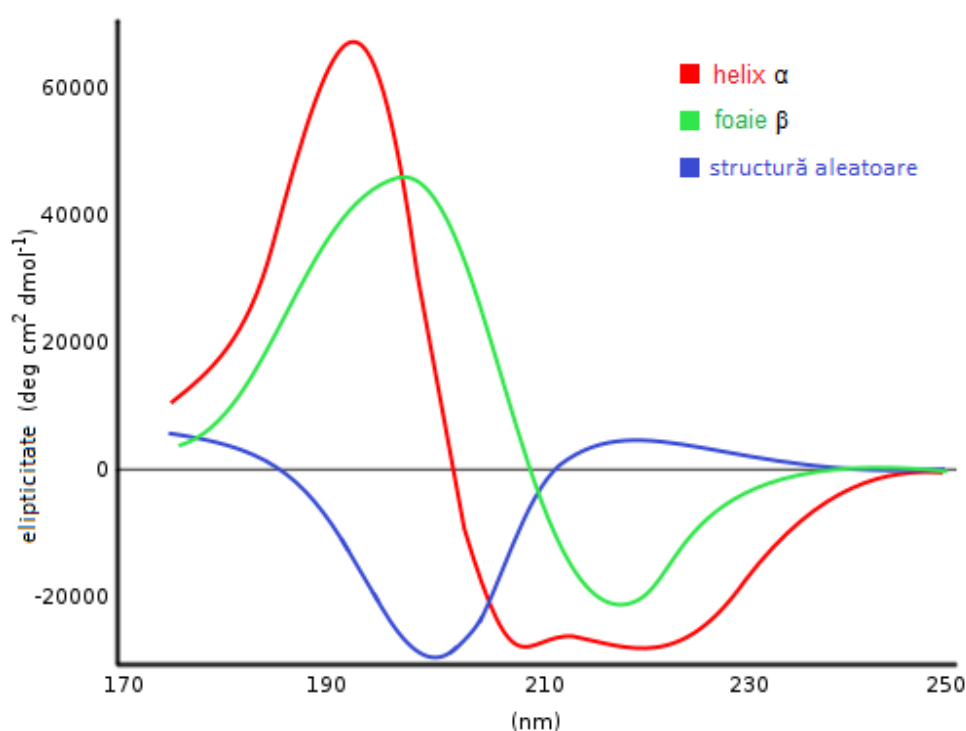


Figura 2-4. Exemple de spectre CD, ilustrând maniera în care acestea pot fi folosite pentru determinarea tipului de structură secundară a unei proteine.<sup>25</sup>

### 2.4.3. Dicroismul magnetic circular (MCD, VT/VH-MCD)

Dacă spectroscopia CD se efectuează plasând proba într-un câmp magnetic, atunci pot fi urmărite selectiv semnalele centrilor paramagnetici – prin urmare și cele ale metalelor tranziționale aflate în stări de oxidare corespunzătoare (ex., Figura 2-5). Mai mult, comportamentul diferit în funcție de temperatură (măsurându-se în domeniul ~4-300 K) al paramagneților de natură organică și respectiv a metalelor tranziționale permite discernerea celor două clase de centri, iar măsurarea spectrelor la temperaturi și câmpuri magnetice diferite (variable temperature, variable field, VT/VH) permite, după aplicarea unor algoritmi standard, stabilirea numărului de electroni neîmperecheați ai probei și aflarea de informații despre natura liganzilor prezenți

în jurul metalului. Solomon și colaboratorii au fost printre cei care au demonstrat cum, având la dispoziție o bază de date de spectre de referință, un spectru MCD poate indica starea de oxidare, gradul de nuclearitate și numărul de coordinare al unui centru metalic necunoscut.<sup>26,27</sup>

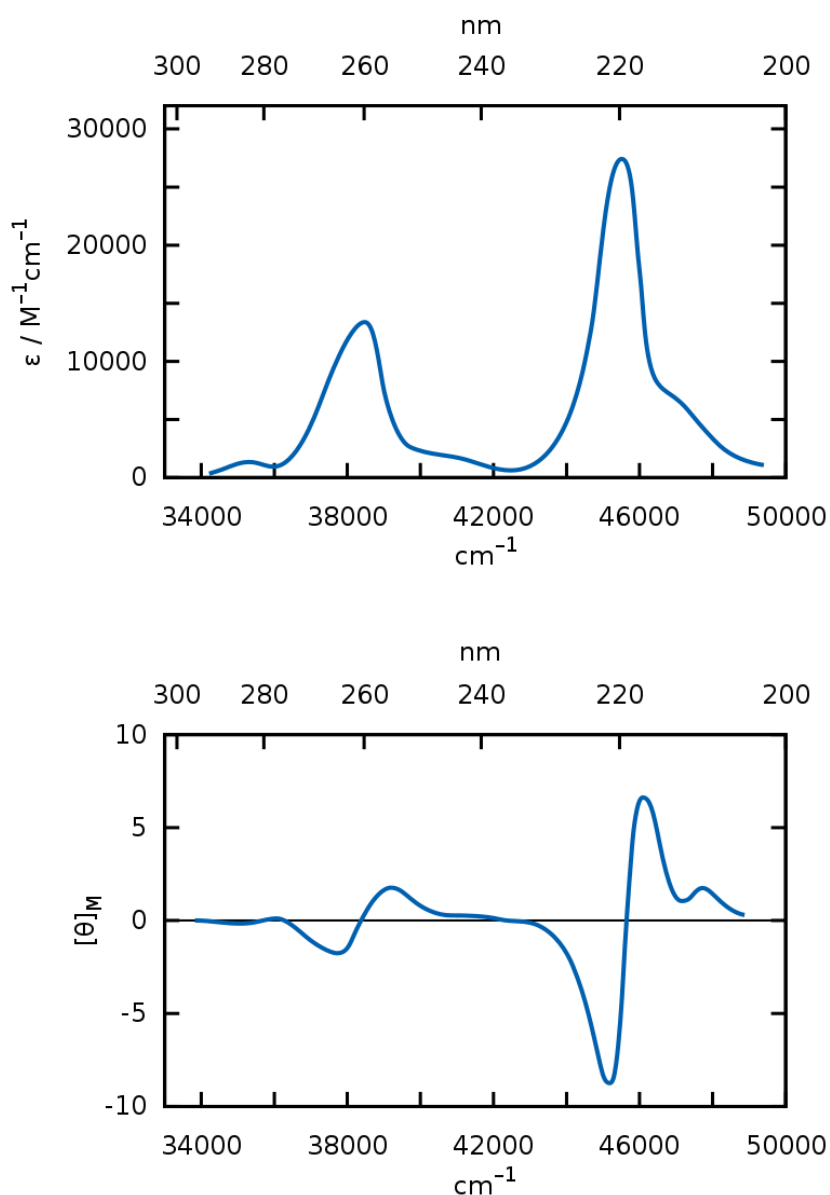


Figura 2-5. Ilustrare a comparației dintre un spectru UV-vis și unul MCD.<sup>28</sup>

#### 2.4.4. Fluorescența

Când experimentul UV-vis se modifică astfel încât detectorul să fie plasat la un unghi de 90° față de fasciculul incident, se poate estima măsura în care electronul excitat luminos poate să revină pe nivelul de energie fundamental prin emisie de lumină, în locul emisiei de căldură obișnuite. Acest fenomen de fluorescență este propriu părții organice a metaloproteinelor (aminoacizi aromatici ca triptofanul, cofactori aromatici ca FMN) – și este prin urmare un instrument indirect de urmărire a unui centru metalic. Metoda poate fi adaptată pentru măsurători cantitative.<sup>29</sup>

## 2.5. Spectroscopia vibrațională (IR, rezonanță Raman)

Spectroscopia vibrațională în infraroșu (IR) folosește lumina în domeniul infraroșu ( $\sim 100\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ), fotonii absorbiți provocând de data aceasta nu saltul unui electron, ci intrarea unei legături (sau grupuri de legături) chimice în rezonanță de vibrație. Prin urmare, poziția unei benzi în spectrul IR oferă informații directe asupra tăriei legăturii implicate în vibrația respectivă sau a gradului/tipului de simetrie de la un centru (în funcție de numărul de atomi implicați în vibrația respectivă). Pe de altă parte, legi de tipul Lambert-Beer pot fi aplicate în mai mică măsură aici, din motive de ordin tehnic care privesc modul de preparare a probei; dacă la spectroscopia UV-vis proba lichidă (de obicei o soluție diluată, într-un solvent standard – de preferință apa, pentru proteine) se așeza de obicei într-o cuva de dimensiuni standard transparentă la lumina UV-vis incidentă, există mult mai puține materiale transparente la lumina IR; majoritatea instrumentelor IR folosesc fie pastile de bromura de potasiu în care proba solidă a fost dispersată prin mojarare, fie suspensii ale substanței respective în ulei de nuiol (hidrofob) plasate sub forma unui film între ferestre de bromura de potasiu șlefuite – ceea ce înseamnă ca fie drumul optic, fie concentrația, sunt greu de controlat cu precizie și relativ greu reproductibile. Procedurile descrise mai sus nu sunt aplicabile proteinelor, ele necesitând un mediu apos incompatibil cu menținerea bromurii de potasiu în starea cristalină/solidă necesară măsurătorii. Acolo unde se poate măsura totuși un spectru (prin folosirea unor cuve speciale, sau prin depozitarea probei pe o suprafață și măsurarea prin reflexie, cu așa-numitele dispozitive ATR), spectrele vor fi extrem de complicate datorită suprapunerii vibrațiilor miilor de atomi prezenți alături de metal. Una din posibilitățile de simplificare a spectrului este de a măsura diferențe între spectrele a două stări diferite ale proteinei, care diferă doar la nivelul centrului metalic; într-un astfel de spectru-diferență, benzile datorate doar părții proteice se anulează reciproc – ieșind în evidență numai benzile ale căror poziții sau existență au fost afectate în urma reacției. O variantă atractivă pentru centrul metalic, în măsura în care ei prezintă un spectru UV-vis măsurabil, este spectroscopia de rezonanță Raman. În cadrul acestui experiment se măsoară un spectru Raman (conceptual, oferind aceleași informații ca cel vibrațional clasic, cu unele diferențe în ce privește măsura în care o bandă este vizibilă – diferențe care țin de elementele de simetrie), dar cu observația că proba este excitată cu un fascicul laser de lungime de undă similară benzilor de absorbție din spectrul UV-vis al aceleiași probe. În măsura în care banda UV-vis respectivă implică orbitali localizați la metal, laserul potrivit la această lungime de undă va provoca excitarea selectivă a centrului metalic și a celorlalți atomi implicați în tranziția UV-vis; această excitare selectivă se va traduce într-o creștere semnificativă a intensității relative a benzilor din spectrul vibrațional asociate cu acești atomi, comparativ cu toate celelalte, permițând astfel observarea selectivă a vibrațiilor asociate metalului chiar în molecule de sute de mii de atomi, în care spectroscopia IR clasică este puțin fezabilă. Pe de altă parte laserul folosit poate induce fotoreacții nedorite în probă, fapt pentru care majoritatea aparatelor de rezonanță Raman operează pe probe înghețate.

Figura 2-6 prezintă un spectru de rezonanță Raman tipic.

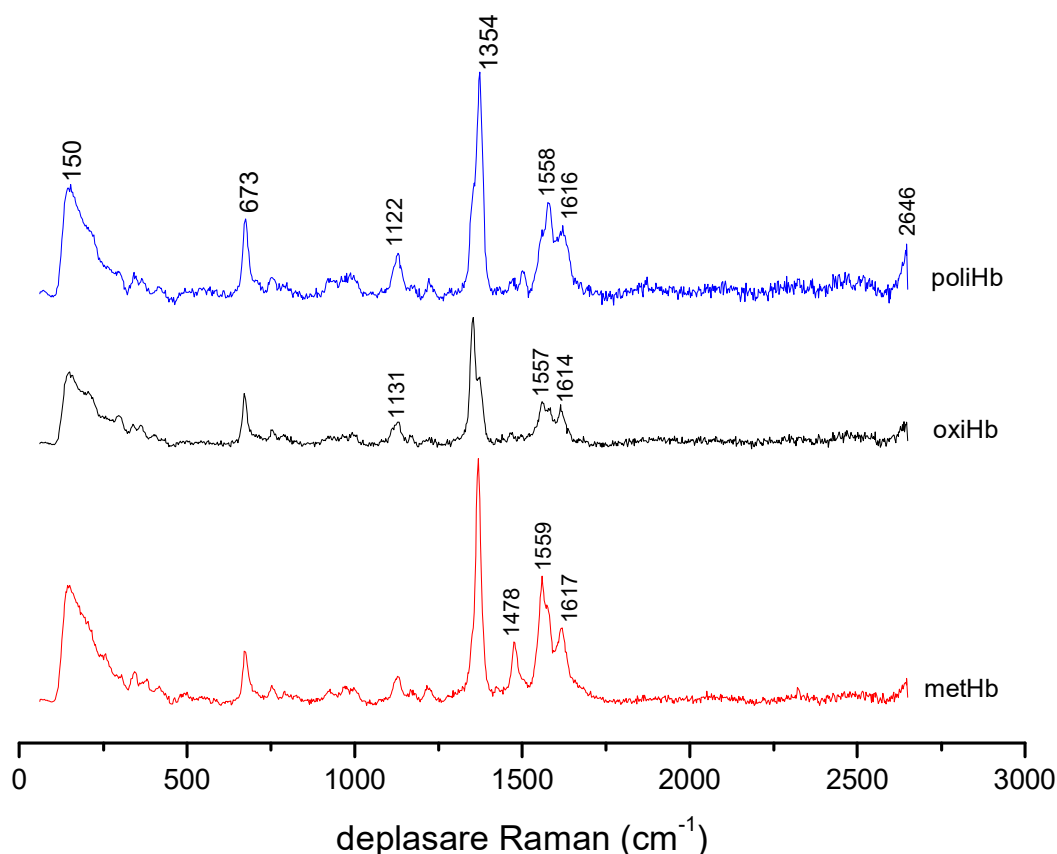


Figura 2-6. Spectre de rezonanță Raman ale hemoglobinei în două stări de oxidare diferite (oxi Fe(II), respectiv met Fe(III), respectiv într-un amestec (poliHb).

## 2.6. Spectroscopia Mössbauer

Acest tip de spectroscopie se aplică aproape exclusiv fierului, întrucât necesită izotopi speciali, dintre care se întâmplă ca  $^{57}\text{Fe}$  să fie cel mai accesibil; mult mai rare sunt exemplele de aplicare a spectroscopiei Mössbauer pentru alte elemente, ca de exemplu staniul. Limitarea aceasta, dincolo de dezavantajul evident, are avantajul unei selectivități unice între metodele discutate în acest capitol. Semnalele obținute, mai ales dacă sunt măsurate până la temperaturi de 4 K, permit identificarea stărilor de oxidare, de spin, și a nuclearității centrilor metalici (inclusiv, pentru centrii bi- sau multinucleari, a constantelor de cuplaj și implicit a naturii liganzilor în punte între cei doi liganzi); de asemenea, prin comparare cu spectre deja măsurate, se pot trage concluzii despre natura liganzilor existenți la fier. Metoda este foarte costisitoare, atât prin prisma instrumentului propriu-zis, cât și pentru că acesta detectează doar izotopul 57 al fierului. Deoarece acest izotop este prezent în concentrație foarte mică în natură; acolo unde este posibil, probele sunt prin urmare adesea preparate pornind de la fier îmbogățit în izotopul 57.

Un spectru Mössbauer tipic este prezentat în Figura 2-7. Notăm că un semnal Mössbauer este descris de către parametrii  $\delta$  și  $\Delta E_q$  (isomer shift – deplasare de izomer și quadrupole splitting – despicare de cuadropol) în ce privește poziția și gradul de despicare relativ la standardul de fier metalic, în timp ce intensitatea semnalului este proporțională cu concentrația în probă.

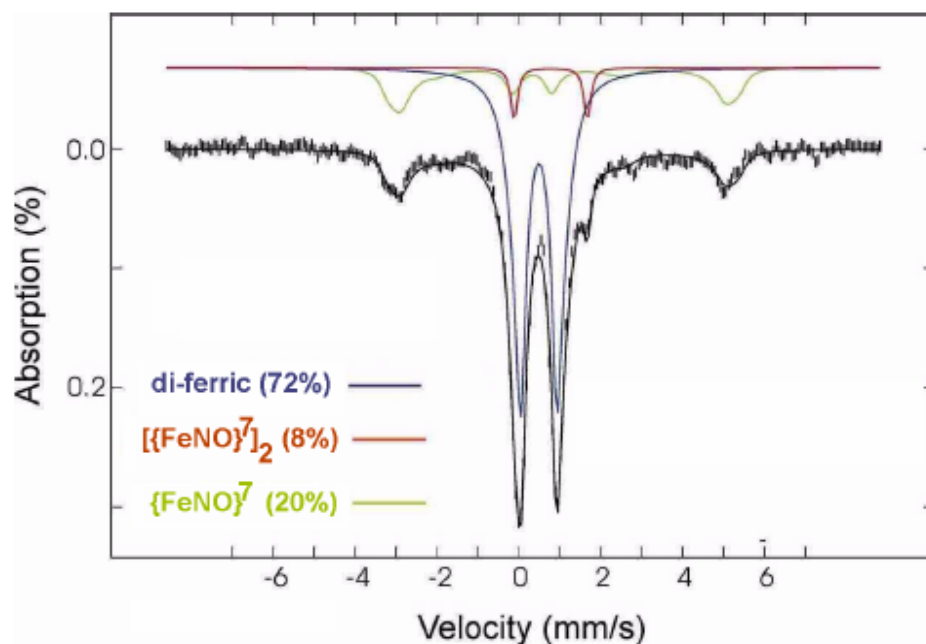


Figura 2-7. Un spectru Mössbauer reprezentativ.

Linia punctată reprezintă datele experimentale, în timp ce cele continue reprezintă simulări, și respectiv o sumă ponderată a acestora, pentru tipurile de centri de fier indicați în Figură.<sup>30</sup>

## 2.7. Spectroscopia de rezonanță electronică paramagnetică (REP, RES)

Spectroscopia de rezonanță electronică paramagnetică (REP), numită și de rezonanță electronică de spin (RES) permite investigarea selectivă a centrilor paramagnetici – și, cu precădere, a celor care au un număr *impar* de electroni neîmperecheați. Interacțiunea dintre câmpul magnetic și electron are în acest caz la bază proprietatea electronului de a se învârti în jurul propriei axe, ceea ce în condițiile în care acesta poartă și o sarcină electrică (negativă) transformă electronul într-un magnet. În condiții normale, orientarea relativă a acestui magnet în spațiu nu este supusă vreunei constrângeri *a priori* într-o moleculă; pe de altă parte, dacă molecula este plasată într-un câmp magnetic exterior, se definesc două orientări posibile ale electronului: având câmpul magnetic propriu fie aliniat paralel, fie aliniat antiparalel cu orientarea câmpului magnetic aplicat din exterior. Diferența de energie dintre cele două stări este, desigur, proporțională cu intensitatea câmpului magnetic. Prin analogie cu alte tipuri de spectroscopie, un salt de la starea energetică favorabilă la cea mai puțin favorabilă ilustrată în Figura 2-8 poate avea loc atunci când moleculei i se furnizează din exterior energie electromagnetică sub forma unei cuante a cărei energie este egală cu diferența de energie dintre cele două nivele ilustrate în Figură. În cazul spectroscopiei RES, domeniul de radiație necesară saltului între cele două stări energetice este cel al microundelor; astfel, ideea experimentului ar fi să se plaseze proba într-un câmp magnetic de magnitudine fixă și să se supună apoi unui fascicol de microunde cu lungime de undă variabilă, urmărind-se la ce lungimi de undă absoarbe proba. Din motive practice, se preferă varierea intensității câmpului magnetic cu menținerea la valoare constantă a lungimii de undă a radiației de microunde.

Figura 2-9 ilustrează un spectru RES tipic, ce prezintă semnale pentru centri metalici și respectiv pentru un radical liber non-metalic.

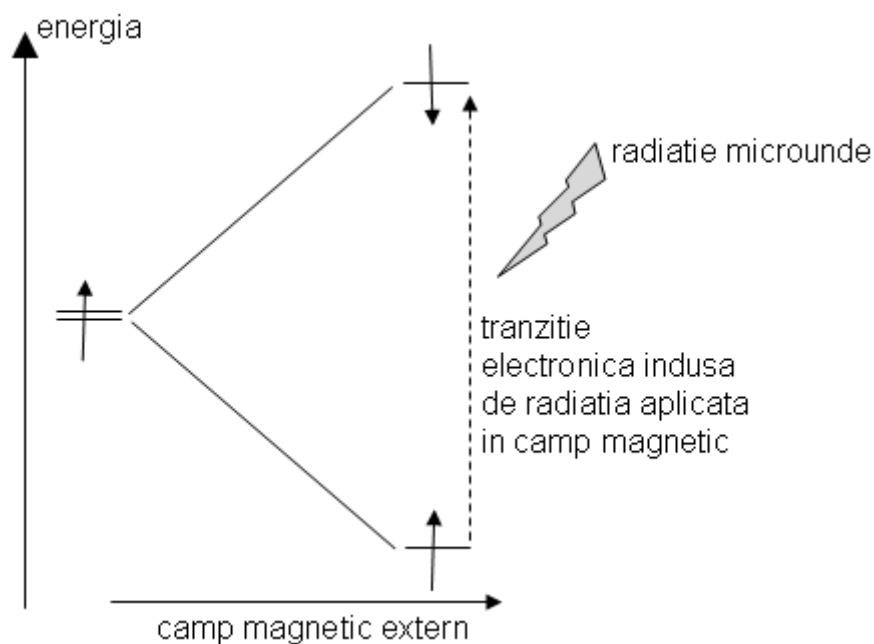


Figura 2-8. Principiul de funcționare al spectroscopiei RES.

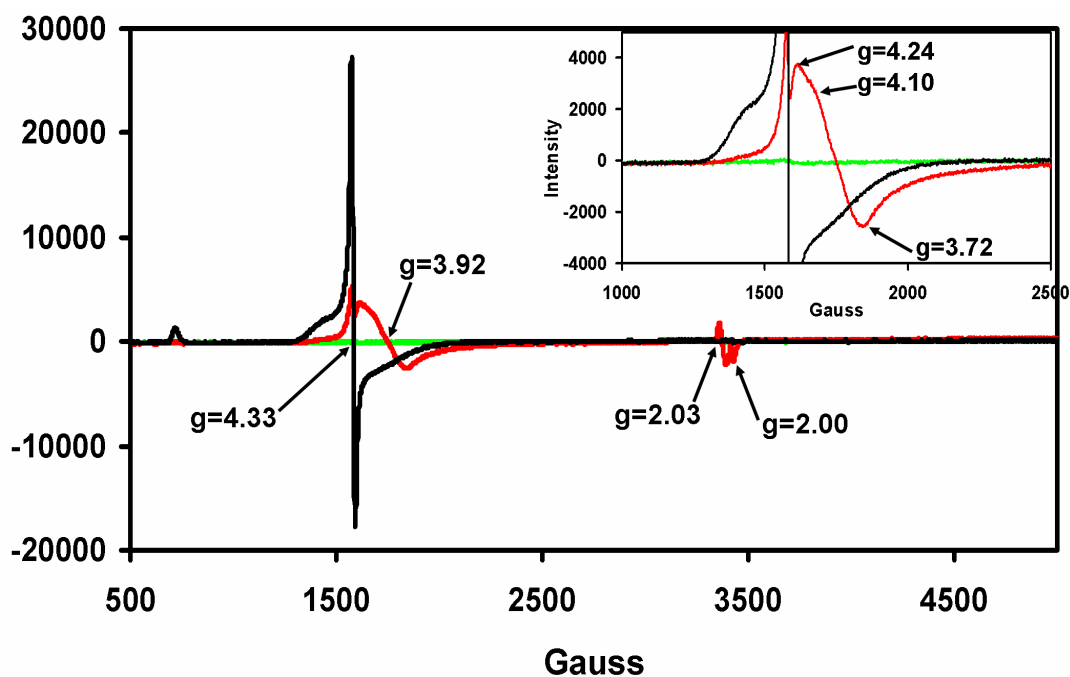


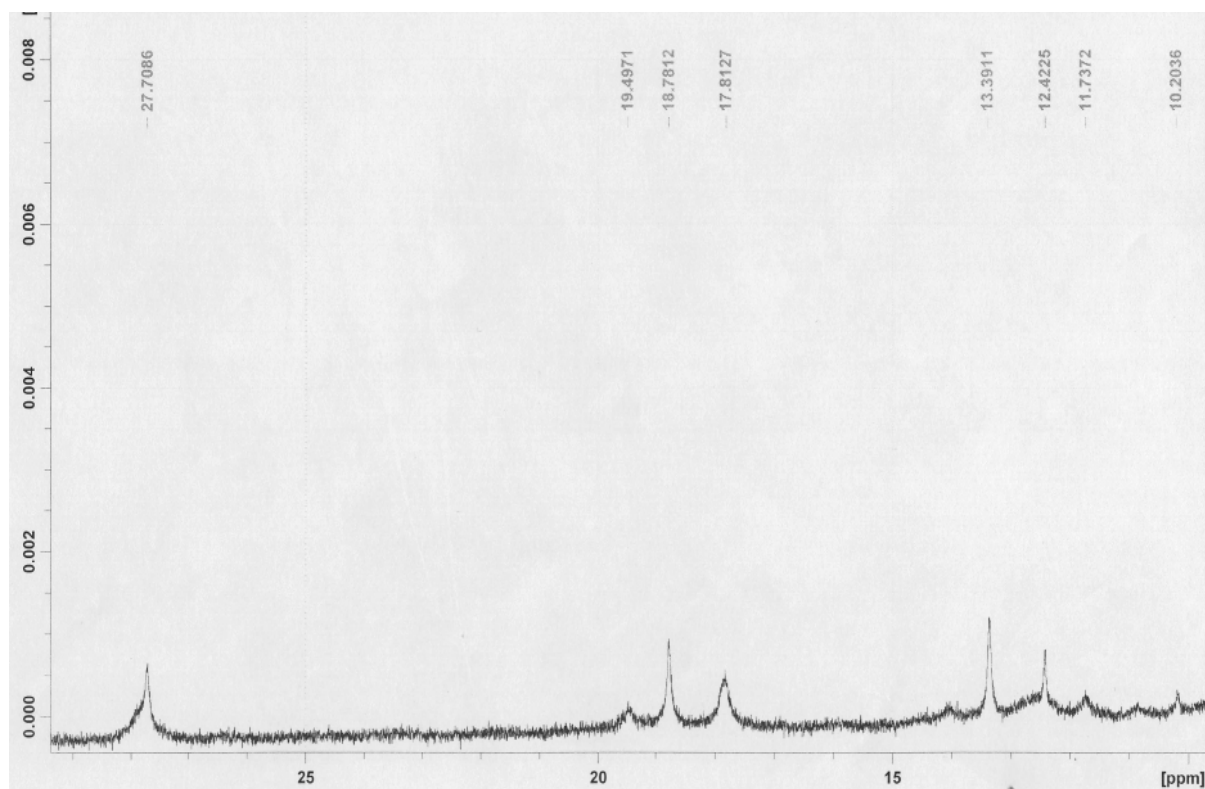
Figura 2-9. Spectrul RES al unui amestec de reacție care conține centri metalici de spin înalt ( $S=5/2$ , 500-1400 G) și respectiv jos ( $S=1/2$ , 2000-3500 G).<sup>30</sup>

## 2.8. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN)

RMN funcționează după un principiu similar RES. Dacă la RES cheia experimentului era proprietatea magnetică a electronului, la RMN este vorba de proprietatea magnetică a nucleului. Ca și în cazul electronului, nucleul dă naștere unui câmp magnetic. La fel ca în cazul RES, orientarea acestui câmp magnetic al nucleului relativ la restul moleculei nu este supusă vreunei limitări în condiții normale, însă este limitată la două poziții fezabile din punct de vedere cuantic

atunci când molecula este plasată într-un câmp magnetic: anume, dipolul magnetic nuclear se va orienta fie paralel fie antiparalel câmpului magnetic aplicat din exterior. Ca și în cazul RES, se va supune proba unei radiații electromagnetice din domeniul microundelor, radiație ce va fi absorbită de probă numai în condițiile în care energia cuantelor intrate în probă este egală cu diferența dintre energiile celor două stări accesibile nucleului, așa cum se arată și în Figura 2-8 pentru RES.

Experimentul RMN poate fi aplicat unui număr mare de nuclee, dintre care cele mai folosite sunt de departe  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$ . Condiția principală este ca nucleul respectiv să aibă un spin nuclear diferit de zero. Energia de rezonanță, necesară tranziției nucleare, va fi, pentru un anumit tip de nucleu, influențată de densitatea electronică din jurul său și prin urmare va informa asupra structurii locale a moleculei în jurul nucleului respectiv. Specifice chimiei bioanorganice ar fi aplicațiile, mult mai rare, în care se detectează nuclee metalice (Zn, Co), sau în care se urmărește influența prezenței metalului asupra semnalelor RMN ale altor nuclee – în primul rând hidrogen sau carbon. Această influență este controlată în mare măsură de distanța dintre nuclee, întrucât între ele există și posibilitatea unei interacțiuni magnetice directe, ca și a uneia electronice sau electrostatice. Pe de altă parte o utilitate indirectă pentru înțelegerea centrilor metalici din proteine sau acizi nucleici vine și din aceea că metodele RMN moderne permit, prin analiza nucleelor de carbon, azot și hidrogen și a distanțelor între acestea, determinarea structurilor tridimensionale a biopolimerilor. Figura 2-10 arată un spectru RMN tipic al unei metaloproteine, în care se urmăresc nuclee  $^1\text{H}$ .



**Figura 2-10. Spectrul RMN de protoni al hemoglobinei, ilustrând protoni organici dar puternic dezecrași din cauza centrului metallic (reamintim că domeniul tipic în care apar semnalele protonilor în compușii organici este 0-10 ppm.<sup>29,31</sup>**

Prin cuplarea tehnicilor RMN și RES se pot proba în mai mare detaliu sisteme care îndeplinesc criteriile necesare ambelor metode; metoda este cunoscută sub acronimul de ENDOR (electron-nuclear double resonance).

## 2.9. Spectroscopia de absorbție de raze X (XAS, EXAFS)

Spectroscopia de absorbție de raze X (XAS) implică interacțiunea acestei radiații cu electronii apropiați de nucleu, și nu de cei din straturile exterioare care erau implicați în experimentele UV-vis. Mai mult, spre deosebire de UV-vis, unde absorbția energiei rezulta în promovarea unui electron pe un nivel energetic superior reținându-l astfel în moleculă, la XAS electronul este în cele din urmă expulzat definitiv din învelișul electronic al atomului respectiv. Energia necesară acestui fenomen de ionizare va fi influențată, în măsură detectabilă, nu numai de identitatea elementului ci și de starea sa de oxidare; de asemenea, elemente de simetrie din jurul atomului respectiv pot dicta forma detaliată a spectrului, furnizând astfel și informații asupra tipului de geometrie de coordinare.

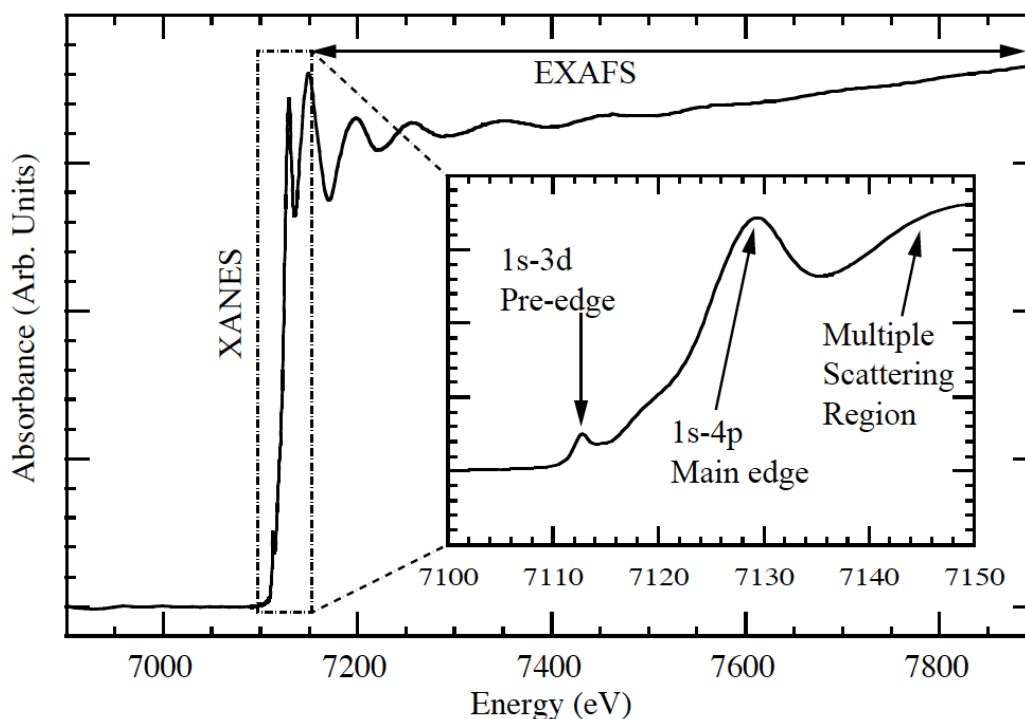


Figura 2-11. Spectru XAS tipic.<sup>32,33</sup>

Odată expulzat din atom așa cum s-a descris mai sus, electronul suferă un fenomen separat de cele întâmplate până acum: el călătorește până la nucleele vecine, de care este respins. Sistemul de detecție va percepe nu doar fenomenul inițial, de ionizare, ci și fenomenul de rezonanță în care electronul călătorește între nucleul de lângă care a fost expulzat și nucleul învecinat. Așa cum se ilustrează în Figura 2-11, cele două părți ale spectrului XAS – cea de absorbție propriu-zisă și cea de reflectare a electronului între nuclee, nu numai că sunt bine delimitate ca domenii de energie, dar sunt și interpretabile separat întrucât oferă informații în mare măsură disjuncte: zona de absorbție („edge” în limba engleză) descrie starea de oxidare



și simetria, pe când zona de reflectare oferă, așa cum este de așteptat din faptul ca electronul este reflectat de atomii din jur, informații asupra tipurilor de atomi din jurul nucleului examinat și asupra distanței față de acești atomi. Pe scurt, putem afla, în principiu cu o precizie de 0.01-0.02 Å, de departe cea mai mare între metodele structurale disponibile în biologie, câți liganzi se află în jurul atomului central (de obicei metalic), la ce distanțe, și de ce tip. O limitare a metodei este că nu poate distinge între nuclee similare; astfel, nuclee ca oxigenul și azotul se comportă similar și nu se poate distinge între ele, așa cum nici între sulf și clor nu se poate face o diferență.

Din punct de vedere practic, tehnicile experimentale sunt dezvoltate la acest moment pentru XAS în special a nucleelor mai mari (metale tranzitionale, sau sulf); experimentul este fezabil însă și pe nuclee mai mici.

## 2.10. Difrakția de raze x pe monocristal și alte metode structurale

Difrakția de raze x pe monocristal (tradițional numită simplu difracție de raze x) este de departe cea mai pretențioasă dintre metodele discutate până acum, din punct de vedere al cerințelor pe care trebuie să le îndeplinească proba: aceasta trebuie să se prezinte sub forma de cristal de înaltă puritate, ceea ce pentru multe biomolecule este extrem de dificil de realizat. Structura regulată a moleculelor în interiorul cristalului permite, atunci când proba este plasată într-un fascicul de raze x, difractarea acestui fascicul de către electronii din jurul atomilor prezenți în cristal. Rotindu-se cristalul și înregistrându-se modelele de difracție pentru o gama largă de unghiuri sub care este acesta lovit de fascicul, se poate determina, prin transformări matematice, structura tridimensională a densității de electroni din interiorul unei celule elementare a cristalului. Se construiesc apoi modele atomice care să se potrivească optim în interiorul acestei densități electronice; modelul care se potrivește cel mai bine este prezentat de obicei sub termenul de „structura de raze x a moleculei”. Alături de RMN, difrakția de raze x este probabil cea mai spectaculoasă metodă de analiză, prin aceea că oferă posibilitatea determinării exacte a structurii tridimensionale a unei molecule; este important însă de notat ca ea ne oferă direct doar harta densității de electroni; identitatea și pozițiile atomilor în interiorul acestei densități rămân încă rodul unui model propus de cercetător și pot fi supuse din acest punct de vedere erorii.

În competiție cu difrakția de raze x sunt trei metode mai rar folosite deocamdată, dar cu perspective de dezvoltare notabile. Prima ar fi difrakția de raze x pe pulberi. Aceasta poate fi privită ca o variațiune a metodei pe monocristal, doar că acum proba se prezintă ca o multitudine de microcristale (pulbere). Metoda este de multă vreme folosită în știința materialelor, dar recent a început să dea rezultate, fie și de precizie mai mică decât variante pe monocristal, pentru structuri de biomolecule/proteine.<sup>34,35</sup> O a doua metodă structurală mai puțin folosită este difrakția de neutroni; ea funcționează ca principiu similar cu cea de raze x și are avantajul de permite mai ușor observarea protonilor. O a treia metodă, încă în plină dezvoltare, este microscopia electronică.<sup>36,37</sup> Rezoluția ei este mult mai slabă decât a metodelor de difracție, dar permite în schimb analiza ansamblurilor foarte mari de proteine, altfel greu accesibile pentru metodele bazate pe monocristal.

## 2.11. Metode speciale pentru analiza speciilor instabile ale metalelor

### 2.11.1. Lucrul la temperaturi joase

Pentru detectarea/analiza speciilor care la temperatura camerei ar fi instabile, coborârea temperaturii mult sub 0°C este o opțiune evidentă. Cum la astfel de temperaturi soluțiile apoase de metaloproteine ar îngheța, se apelează la trei tipuri de abordare:

- (1) Se îngheață o formă stabilă a metaloproteinei, iar apoi se declanșează o reacție chimică în forma înghețată, prin iradiere. Iradierea poate avea loc direct în timpul unei măsurători spectroscopice, sau se poate face separat stocând apoi proba în azot lichid până la măsurare. Exemple mai des raportate de astfel de abordări implică folosirea radiației din domeniul UV-vis pentru a genera/analiza stări electronice excitate meta-stabile, sau folosirea radiațiilor de mare energie  $\gamma$  sau  $x$ , care eliberează electroni în matricea înghețată și prin urmare pot iniția reacții redox.<sup>38,39</sup>
- (2) Se îngheață la temperatura azotului lichid un amestec de reacție imediat după amestecarea reactanților, iar apoi proba se stochează pentru analiză ulterioară. Dispozitivele care permit amestecarea și înghețarea la timpi foarte scurți și controlați sunt denumite freeze-quench (stingere prin înghețare), iar spectroscopiile care se pretează cel mai des la astfel de experimente sunt RES și Mössbauer. Cel mai timpuriu moment în timp după amestecarea reactanților la care se poate îngheța proba într-un dispozitiv freeze-quench este de 20–30 milisecunde; în unele dispozitive experimentale se poate coborî până în domeniul micro-sekundelor.<sup>40</sup>
- (3) Se realizează reacția de interes într-un amestec de soluție tampon și co-solvent organic, care se poate răci atunci și mult sub 0°C. Opțiunea aceasta nu se pretează pentru orice proteină/reacție, pentru că poate necesita proporții mari de co-solvent (etilenglicol, glicerol, etanol, metanol, DMF, DMSO sunt opțiuni folosite), de până 50% – în timp ce unele proteine pot fi denaturate chiar și de către câteva procente de co-solvent. Temperaturi de -20 – -40°C pot fi ușor atinse cu oricare dintre acești co-solvenți; limita ar fi spre -80°C, dacă se folosește metanol.<sup>30</sup>

### 2.11.2. Tehnici ultrarapide – *stopped-flow, flow, jump, flash*

Acolo unde se urmăresc specii cu durată de viață foarte scurtă, o opțiune poate fi și să se folosească metode spectroscopice cu timp de răspuns foarte scurt (foarte rapide). Una dintre acestea este tehnica stopped-flow, unde (cf. Figura 2-12) spectrul este măsurat începând cu momentul de imediat după amestecarea reactanților (cca 1-2 milisecunde sunt posibile pe instrumentele comerciale disponibile în prezent). Numele tehnicii vine de la faptul că, pentru a evita interferențele din cauza turbulențelor provocate de soluția în mișcare, măsurătoarea spectroscopică este declanșată după ce (1) reactanții au fost amestecați și (2) curgerea amestecului proaspăt preparat prin cuva de observare a fost oprită. Tehnica stopped-flow este folosită aproape universal în combinație cu spectroscopia UV-vis, însă adaptări pentru alte spectroscopii (CD, IR) sunt de asemenea disponibile. Mai recent, dezvoltarea tehnicilor de fluidică și spectroscopie a permis și dezvoltarea de metode similare cu stopped-flow, dar unde stoparea curgerii nu mai este necesară (așadar, metode „flow”). Cele mai clare adaptări flow au fost descrise pentru spectroscopia vibrațională, însă exemple din zona RES sau UV-vis există de asemenea.

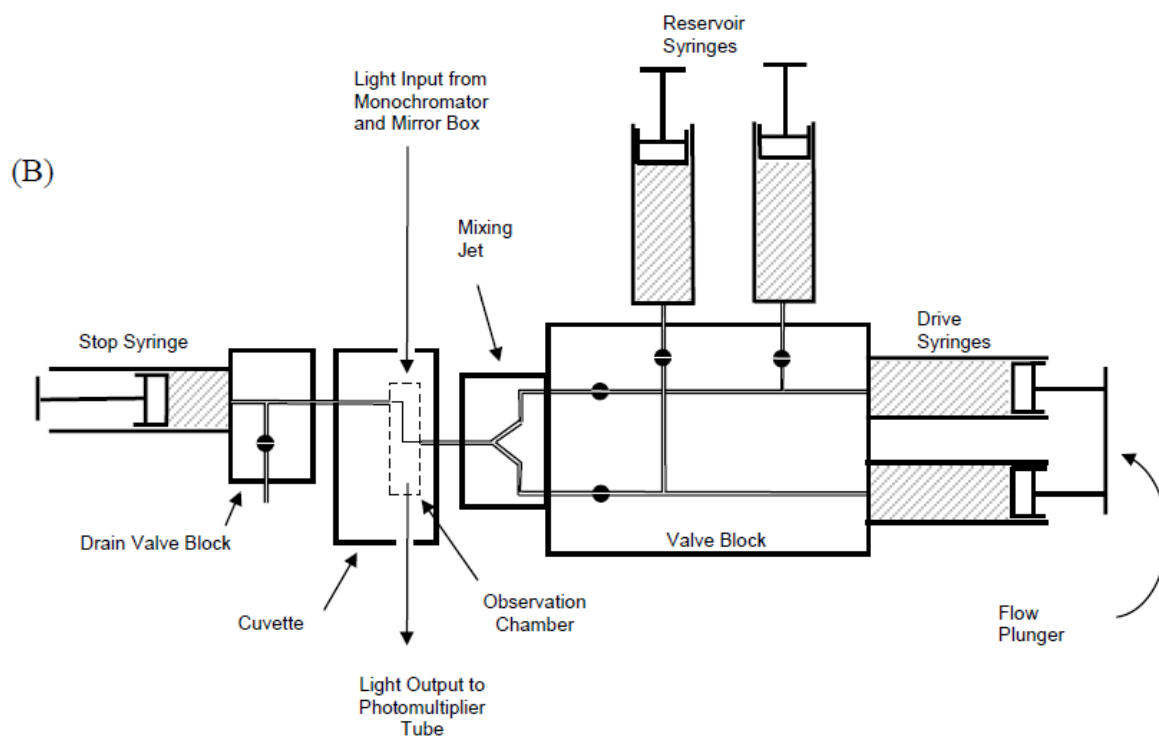


Figura 2-12. Schema de principiu a unui aparat stopped-flow.

În cazurile speciale discutate și în secțiunea anterioară, situsul metalic poate fi sensibil la radiația din domeniul UV-vis (livrată, desigur, sub formă de fascicul intens, laser) în așa măsură încât să aibă loc o reacție chimică detectabilă spectroscopic (de exemplu, disocierea unui ligand) – de obicei prin UV-vis, fluorescență sau IR. Un avantaj al acestor tehnici (numite după caz flash, sau jump) este timpul de răspuns foarte rapid (care poate coborî, în funcție și de performanțele laserului, până la nivel de femtosecunde sau și mai jos), întrucât nu mai trebuie să așteptăm după amestecarea reactanților.

## 2.12. Liganzi sondă

O tehnică tipic folosită pentru investigarea reactivității și structurii centrilor bioanorganici este adăugarea unui ligand exogen care servește drept sondă de explorare. Astfel de liganzi pot oferi informații despre măsura în care situsul este accesibil pentru liganzi, despre mediul din jurul situsului activ, despre intermediari de reacție. În unele cazuri ligandul-sondă activează metalul pentru o măsurătoare spectroscopică ce altfel ar fi fost imposibilă (sau, la nevoie, viceversa). Spre exemplu, monoxidul de azot NO adaugă un electron neîmperecheat sistemului, ceea ce poate face trecerea de la o stare diamagnetică la una paramagnetică, permițând aplicarea de tehnici spectroscopice suplimentare (în primul rând RES). Liganzii NO,  $N_3^-$ ,  $CN^-$  și CO pot de asemenea să schimbe starea de spin a centrului metalic (coborând-o în general, ceea ce poate de asemenea deschide calea către investigații spectroscopice altfel imposibile pentru centrul respectiv. Acești 4 liganzi, prin natura legăturilor lor multiple interne (ex., triplă carbon-oxygen), oferă de asemenea posibilitatea detectării de semnale în regiuni mai accesibile/libere ale spectrului vibrațional, unde biomoleculele nu oferă așa de multe interferențe. De asemenea, mulți liganzi-sondă activează sau cel puțin modifică benzi în spectrele UV-vis.

Liganzii sondă cei mai tipic folosiți sunt cei foarte mici, de genul celor discutați în paragraful anterior. Pe de altă parte, când se are în vedere explorarea dimensiunilor/limitărilor sterice ale situsului din jurul metalului, se poate recurge și la liganzi-sondă mai mari, precum imidazolul sau fenolul și derivații acestora.

### 2.13. Chimia computațională

Metodele care folosesc calculatorul pentru a simula moleculele și proprietățile acestora sunt definite ca „chimie computațională”. Cum chimia computațională operează doar pe calculator, fără experimente în laborator, i se asimilează adesea titlul de „chimie teoretică”. Trebuie subliniat însă că termenul de chimie teoretică descrie în general multe alte aspecte ale chimiei – și că o bună parte a teoreticienilor chimiei nu folosesc și nu au folosit calculatorul pentru a rezolva problemele de cercetare științifică pe care și le-au propus. În același timp, chimia computațională este azi atât de accesibilă încât o folosesc mulți specialiști în chimie experimentală, fără a se autointitula „teoreticieni” și fără a fi experți în chimie cuantică sau chimie fizică.

Pentru a pune lucrurile în context, vom sublinia că în general definim „teoria” ca fiind un set de reguli postulate/propuse/presupuse a governa un sistem. Teoriile au în general expresii cantitative (ex.,  $E=mc^2$ , or  $F=kq_1q_2/r^2$ ), ceea ce permite testarea experimentală/empirică a domeniului de condiții în care teoria este valabilă/aplicabilă. Acest aspect cantitativ este esențial, întrucât o teorie care nu poate fi supusă unor astfel de teste este în mare măsură inutilă. Unele teorii primesc titlul onorific de „legi” – ex., „legea lui Coulomb, descrisă de ecuația  $F=kq_1q_2/r^2$ . Este important să notăm diferența dintre astfel de legi și cele din domeniul juridic: dacă legile juridice sunt decise de oameni/societate ca o formă de alegere conștientă a direcției în care ar trebui să se îndrepte lumea/societatea umană, „legile” științifice sunt simple constatări descriptive sau interpretări ale modului în care funcționează lumea. Legile care decid viteza maximă a mașinilor pe autostradă pot fi modificate printr-un vot al Parlamentului, dar Legea lui Coulomb nu.

Teoriile tind să aibă ca obiectiv o aplicabilitate cât mai generală/largă. Uneori însă acest fapt le face prea vagi și prea puțin aplicabile la situații concrete din viața de zi cu zi. În acest context definim „modelele” – ca încercări de particularizare și simplificare a unei teorii cu scopul de a o face mai ușor de aplicat în probleme concrete. Adesea, simplificarea adusă prin modele implică și introducerea de constante deduse pe cale empirică. În astfel de situații e esențial să fim conștienți de sursa acelor constante empirice, pentru a înțelege mai bine domeniul pe care acel model este aplicabil. Spre exemplu, un program de calculator antrenat să descrie doar molecule cu legături carbon-carbon și carbon-hidrogen nu va fi util pentru a descrie o moleculă cu legături carbon-carbon duble sau aromatice precum benzenul.

Chimia computațională apelează la modele pe calculator ale moleculelor (sau părților acestora, inclusiv ioni, atomi etc) și/sau ansamblurilor de molecule. În acest sens, se folosește adesea și termenul de „modelare moleculară” pentru a descrie aceste eforturi. Vom nota însă că modelarea moleculelor nu e nevoie să apeleze la calculator; pentru probleme simple (și acest lucru s-a întâmplat în special în zorii chimiei teoretice și până spre finalul secolului XX) problemele de modelare moleculară se pot rezolva cu creionul, hârtia și eventual un set de piese de plastic/lemn de tip lego. În acest context, pentru o parte a specialiștilor termenul de modelare moleculară tinde să fie preferat pentru a descrie astfel de cazuri în care accentul este pe utilizarea

de „modele”, adică de simplificări cât mai simple – ca de exemplu mecanica moleculară, în care atomii sunt aproximați ca sfere rigide iar legăturile chimice ca resorturi elastice, ignorându-se existența electronilor, nucleelor, orbitalilor etc.

Vom întâlni așadar în chimia computațională grupuri diverse de cercetători, de la utilizatorii ocazionali care au cu totul altă specialitate și folosesc elemente de bază ale chimiei computaționale ca o unealtă de rutină asemeni spectroscopiei IR sau RMN, la utilizatori specializați care pot rezolva probleme mai neobișnuite cu ajutorul chimie computaționale (și pentru aceasta au cunoștințe mai avansate de chimie teoretică și de informatică), la cei specializați în crearea sau modificarea de metode – și care vor avea ca principală specializare fie chimia teoretică fie informatica fie ambele.

Am folosit mai sus expresia „unealtă de rutină asemeni spectroscopiei IR sau RMN”; prin aceasta, subliniem că azi chimia computațională nu mai este o simplă „teorie” care poate cel mult să „confirme experimentul”, ci este o unealtă standard de laborator/cercetare care, atunci când este aplicată corect, poate fi privită cu același statut ca unele dintre metodele experimentale clasice. Desigur, la fel ca oricare dintre celelalte metode, precum IR sau RMN, chimia computațională poate fi folosită și greșit sau superficial sau inefficient – iar acest lucru în cazul ei se va vedea mult mai des sau mai ușor decât în cazul metodelor experimentale propriu-zise. Astfel, un aparat RMN costă azi sute de mii de euro iar operarea lui este de asemenea extrem de scumpă, ceea ce face ca utilizatorii lui să fie foarte atent selecțai și instruiți și prin urmare calitatea și sensul rezultatelor sunt atent gândite și verificate; în schimb, pentru a face calcule simple pe modele de molecule azi nu doar că sunt suficiente programe gratuite care rulează pe calculatoare standard, ci, mai mult, se pot efectua calculele online fără a mai avea la îndemână nici măcar propriul calculator. În acest fel, chimia computațională este într-un sens excesiv de accesibilă și mult mai ușor de abuzat, comparativ cu metodele de analiză tradiționale. Totuși, atunci când este corect făcută (și subliniem acest lucru pentru că din păcate el nu este azi norma), autorii acestui text preferă să descrie chimia computațională ca o metodă ce poate fi privită pe picior de egalitate cu alte metode de analiză (precum spectroscopia IR sau cea RMN) – și că se poate inclusiv folosi termenul de „experiment computațional”.

Prin folosirea computerelor tot mai performante dotate cu programe din ce în ce mai sofisticate este posibil studiul moleculelor, al intermediarilor reactivi și al stărilor de tranziție, neizolabile din punct de vedere experimental. Experiența a demonstrat că rezultatele obținute prin calcule adecvate sunt de încredere chiar și în absența unei verificări experimentale. Se pot prezice, cu diverse grade de încredere, orice proprietăți ale unei molecule sau ale unor ansambluri de molecule: structura la nivel atomic, reactivitatea/stabilitatea, culoarea, starea de agregare, proprietățile spectroscopice de orice tip (ex., UV-vis, IR, RMN), conductivitatea electrică, rezistența mecanică etc. Pentru studiul computațional chimiștii au la dispoziție cinci mari clase de metode teoretice.

**Mecanica moleculară (MM)** se bazează pe modelul „ball-and-stick” ce privește molecula ca o colecție de atomi priviți ca sfere rigide și uniți prin resorturi elastice, sistemul fiind supus legilor mecanicii clasice. Dacă se cunosc lungimile legăturilor și ale unghiurilor dintre ele, precum și energia necesară alungirii și comprimării legăturilor, se poate calcula energia acestui ansamblu; schimbând geometria până la găsirea celei mai scăzute energii ceea ce ne permite să facem o optimizare a geometriei adică să calculăm geometria moleculei. Mecanica moleculară se bazează pe parametri empirici (denumiți generic „câmpuri de forțe”; mecanica moleculară

este în general privită atunci ca o metodă de tip empiric), derivați din observații experimentale sau din calcule teoretice mai avansate, despre tăria legăturilor chimice (elasticitatea resorturilor care aproximează legăturile chimice), razele sferelor rigide care aproximează fiecare atom, unghiurile de legătură preferate de către fiecare atom etc. Rezultatele pot fi precise pentru sistemele cu structuri apropiate de cele folosite la parametrizare, dar în alte situații erorile pot fi mari. Avantajul metodei este efortul computațional scăzut, permițând astfel studiul unor molecule mari (mii de atomi – deci proteine întregi spre exemplu sau, pe supercomputere foarte performante, ansambluri de molecule care redau realist compartimente întregi ale unei celule).

**Metodele de granulare grosieră** (coarse grain) preiau ștafeta de la mecanica moleculară și aproximează sistemele moleculare încă și mai grosier: dacă în mecanica moleculară aproximăm atomii ca sfere rigide ignorând detaliile structurale din interiorul atomului (electronii, nucleul, interacțiunea dintre ei), în metodele de granulare grosieră se aproximează ca o singură particulă ansambluri multiatomice. Spre exemplu, într-o proteină formată din zeci sau sute de aminoacizi, fiecare dintre aceștia poate fi aproximat ca o singură particulă. Principiul poate fi extins pentru a defini mărimea „granulei” la latitudinea utilizatorului și în funcție de mărimea sistemului care trebuie studiat – astfel încât limitele de mărime ale sistemelor analizate pot fi împinse foarte departe.

**Metodele chemometrice, bioinformatică și de inteligență artificială** renunță de asemenea la a descrie în detaliu fiecare element și detaliu structural al unei molecule până la nivel subatomic și fac în schimb apel la corelări statistice între proprietăți ale moleculelor pentru a le prezice anumite caracteristici structurale sau proprietăți. Ilustrative aici sunt metodele QSPR (quantitative structure property relationships), QSAR (quantitative structure-activity relationships), aliniamentele de secvențe pentru structurile primare ale proteinelor sau ale acizilor nucleici (ADN în special), sau predicțiile de structură tridimensională ale proteinelor prin omologie cu structuri deja cunoscute (homology modeling). În unele cazuri, astfel de metode sunt folosite în combinație/sinergie cu cele din celelalte categorii – ca de exemplu în cazul metodelor de andocare (docking) care prezic modul de legare al unui ligand la o biomoleculă (în special la proteine).

**Metodele *ab initio*** (*ab initio* = de la primele principii) se bazează în general pe legile mecanicii cuantice (quantum mechanics, QM) și nu implică nici un fel de date experimentale, ci țințesc în general rezolvarea ecuației lui Schrödinger pentru o moleculă. Ecuația lui Schrödinger nu se poate însă rezolva exact pentru sisteme multielectronice. Prin urmare se folosesc o serie de aproximații. Metodele *ab initio* implică în primă instanță aproximația Hartree-Fock (și se folosește atunci expresia „metoda Hartree-Fock (HF)”), ce neglijează energia de corelare, dar și o serie de metode post-HF ce încearcă să recupereze din erorile aduse de aproximațiile inițiale ale HF. Exemple sunt interacțiunea configurațională (CI) și variantele ei multireferențiale (MRCI), teoria perturbațiilor Møller-Plesset, (MP), sau teoria Coupled-Clusters (CC). Calculele *ab initio* sunt relativ lente chiar și pentru sisteme electronice mici, dar ele reprezintă cele mai precise metode disponibile.

**Metodele semiempirice** se bazează și ele pe ecuația lui Schrödinger (deci pot fi privite ca metode QM, la fel ca și cele *ab initio*), însă aceasta este parametrizată cu valori experimentale/empirice, astfel încât integralele complicate ce trebuie calculate prin metode *ab initio* sunt înlocuite cu anumite valori stocate într-o bază de date. Calculele semiempirice dau rezultate bune pentru structurile de echilibru, iar timpul de calcul este de până la 1000 de ori mai scurt

decât în cazul celor la nivel *ab initio*. Ca și metodele de mecanică moleculară, performanța și domeniul de aplicabilitate ale metodelor semiempirice sunt limitate de calitatea și varietatea parametrilor empirici folosiți la parametrizare.

**Teoria funcționalelor de densitate (DFT)**, ca și metodele *ab initio* și semiempirice, se bazează pe ecuația lui Schrödinger (deci sunt de asemenea metode QM), însă nu se calculează funcția de undă ci o funcție a densității electronice. Deoarece nu se cunoaște dependența energiei de corelare și de schimb de densitatea electronică se folosesc funcții cu caracter parțial empiric. Calculele sunt mai ușor de realizat decât cele *ab initio*, metoda fiind potrivită pentru sisteme mai mari.

**Metode hibride QM/MM** combină calculele de mecanică cuantică de înalt nivel, aplicate unui strat al unui sistem cu o metodă mai simplă, aplicată întregului sistem. Pot fi realizate astfel calcule precise pe sisteme mari (clusteri sau macromolecule) luând în considerare doar zona de interes fără a ignora restul sistemului.

**Metodele dinamice** ținesc să descrie evoluția în timp a unui sistem. **Dinamica moleculară** aplică moleculelor legile clasice ale mișcării. În fapt, în general toate metodele descrise mai sus ținesc predicții statice, pe structura de echilibru a unui sistem. Simularea evoluției în timp a sistemului necesită calcularea unei serii foarte mari/extinse de stări ale sale, ceea ce implică un efort computațional adițional semnificativ. Din această cauză, tradițional dinamica a fost aplicată cu metode de tip MM. Mai recent, dinamica *ab initio* (cu metode QM) a devenit însă de asemenea fezabilă. Metode dinamice care urmăresc nu neapărat evoluția în timp a poziției nucleelor cât mai ales evoluția în timp a stărilor electronice sunt de asemenea azi bine încetățenite.

### 3. Proteine specializate în legarea și transportul oxigenului

Molecula de oxigen ( $O_2$ ) este esențială pentru funcționarea organismului uman și a majorității celorlalte tipuri de organisme cunoscute nouă din viața de zi cu zi. Prin urmare, aceste organisme au dezvoltat proteine specializate în stocarea oxigenului molecular și în transportul acestuia prin organism. Din punct de vedere structural, se disting trei clase de astfel de proteine: globinele (ca de exemplu hemoglobina, având ca centru activ un ion de fier), hemeritrinele (cu un centru activ format din *doi* ioni de fier) și hemocianinele (centru activ format din doi ioni de cupru).

#### 3.1. Globine

De departe cea mai cunoscută metaloproteină, hemoglobina se găsește în sânge, localizată în interiorul unor celule specializate exact în transportul și întreținerea ei: celulele roșii, cunoscute și sub numele de hematii sau eritrocite. Rolul hemoglobinei este de a transporta oxigenul de la plămâni către restul organismului. Înrudită structural cu hemoglobina, mioglobina este localizată în celulele musculare și are ca funcție preluarea oxigenului din sânge și stocarea acestuia până la momentul la care este consumat în aceste celule în vederea producerii de energie.

Partea responsabilă de legarea oxigenului în globine este un centru de fier coordinat de porfirină; acest complex, ilustrat în Figura 3-1, este denumit hem.

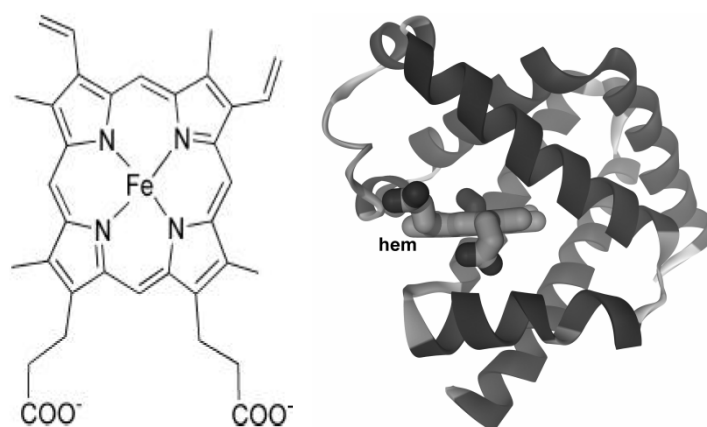


Figura 3-1. Hemul – un complex al fierului cu porfirina, și modul în care acesta este înglobat în structura mioglobinei.

În mioglobină, hemul este înconjurat de un lanț polipeptidic, care se împachetează în spațiu pentru a închide în interiorul său fierul, limitând accesul potențialilor liganzi din exterior. Mai mult, sistemul imidazolic aparținând catenei laterale a uneia dintre histidinele din lanțul polipeptidic se coordonează la fier, care ajunge astfel să fie pentacoordinat, cu o singură poziție de coordonare liberă; această poziție liberă este menținută special pentru legarea oxigenului



molecular. Histidina coordnată la fier este denumită, din pricina apropierii sale de metal, „histidina proximală”. În poziție trans față de histidina proximală, proteina definește o cavitate de dimensiuni limitate deasupra fierului, suficient de mare pentru a permite legarea oxigenului molecular dar prea mică pentru a permite accesul facil al unor molecule mai mari decât  $O_2$ . Esențială în definirea acestei cavități (denumită, prin contrast cu histidina proximală, partea „distală”) este din nou catena laterală a uneia dintre histidinele lanțului polipeptidic. Aceasta a doua histidină este denumită „histidina distală”. Rolul său este propus a fi nu doar unul steric, de limitare a volumului cavității, ci și de a forma o legătură de hidrogen cu oxigenul molecular după ce acesta se leagă la fier (a se vedea și Figura 3-3). Vom nota în acest moment că centrul activ, așa cum a fost descris aici pentru mioglobina, se regăsește în aceeași formă și în hemoglobina umană. Mai mult, lanțul polipeptidic din hemoglobină este foarte similar cu cel al mioglobinei atât la nivel primar (al aminoacizilor componenți) cât și la nivel secundar și terțiar (al organizării spațiale). Principala diferență structurală între hemoglobina și mioglobina umane este faptul că în hemoglobină se regăsesc patru astfel de lanțuri polipeptidice, fiecare purtând propriul hem, astfel încât putem descrie aceasta proteină ca un tetramer ale cărui patru subunități sunt fiecare asemănătoare mioglobinei. În majoritatea organismelor cunoscute, hemoglobina este, asemeni celei umane, tetramerică; există însă și excepții – organisme în care întâlnim hemoglobine dimerice ori conținând mai mult de patru monomeri (24, de exemplu). În hemoglobinele tetramerice cele patru lanțuri sunt de obicei ușor diferite între ele. Astfel, cele patru lanțuri din hemoglobina umană sunt de două feluri: două lanțuri denumite  $\alpha$  și două denumite  $\beta$ ; diferențele dintre  $\alpha$  și  $\beta$  sunt minore, la nivelul structurii primare, și duc la diferențe minore, uneori chiar non-detectabile, de reactivitate între centrii de fier adăpostiți de cele două tipuri de lanțuri.

Motivul pentru care hemoglobina adoptă o structură mai complicată decât mioglobina (tetramer, comparativ cu monomer) poate fi înțeles dacă urmărim în Figura 3-2 profilul afinității față de oxigen a celor două globine. Se observă că în cazul hemoglobinei este nevoie de o concentrație mai mare de oxigen în soluție decât în cazul mioglobinei pentru a ajunge la un grad dat de ocupare a centrilor de fier cu liganzi  $O_2$ . În particular, în cazul proteinelor care leagă oxigenul molecular, concentrația de oxigen, exprimată în termeni de presiune parțială, necesară pentru ocuparea a 50% din centrii de legare (fier, în acest caz) din soluție, este definită ca „p50”. Astfel, p50-ul hemoglobinei este mai mare decât al mioglobinei, ceea ce se traduce prin faptul că hemoglobina are o afinitate mai mică decât mioglobina pentru oxigenul molecular. Motivul pentru care mioglobina ar trebui să aibă o afinitate mai mare față de oxigen decât hemoglobina este simplu: ea trebuie să fie capabilă să atragă în celula musculară molecula de oxigen care circula prin sânge deja legată la hemoglobină. O diferență suplimentară dintre cele două globine se remarcă în forma celor două curbe din Figura 3-2: dacă în cazul mioglobinei forma este cea tipică a unei curbe de legare a unui ligand oarecare la o proteină, descriptibilă de o ecuație exponențială, în cazul hemoglobinei curba adoptă o formă sigmoidală. Aspectul sigmoidal este responsabil în mare parte de faptul că la nivelul celulelor din corp unde este nevoie de oxigen, deci concentrația acestuia în soluție este scăzută, afinitatea hemoglobinei față de acesta este mai mică decât a mioglobinei, ceea ce permite eliberarea lui de pe hemoglobină și transferul lui către mioglobină. Pe de altă parte, la plămâni, unde concentrația de oxigen este mult mai mare, afinitatea hemoglobinei este mult mai bună și ea își poate încărca toate situsurile cu oxigen, pentru a le transporta ulterior către restul organismului. Atât diferența de

formă cât și cea de afinitate (de fapt conectate matematic între ele) dintre curbele celor două globine sunt urmări doar ale structurii tetramerice a hemoglobinei, întrucât, după cum s-a arătat mai anterior, diferențe clare la nivelul centrului activ de fier nu există între cele două globine.

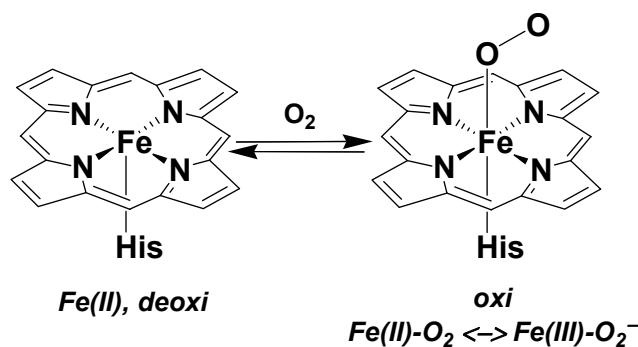
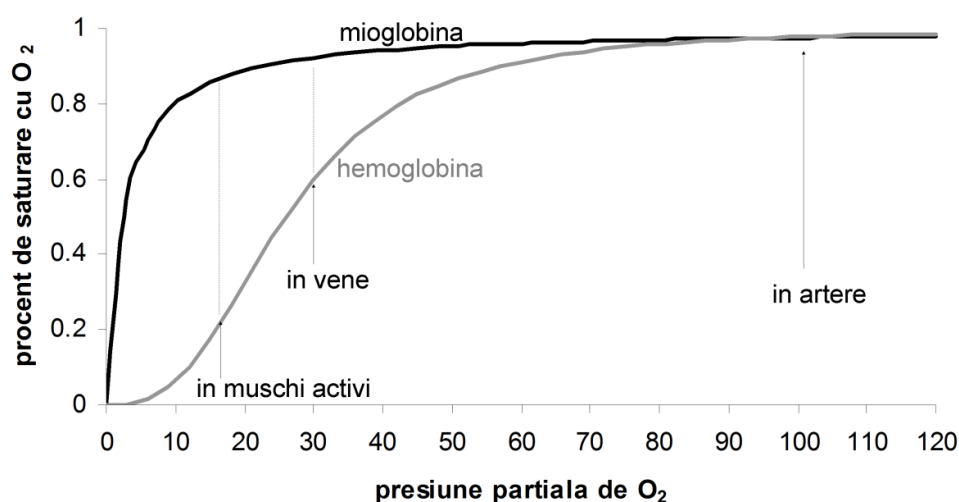


Figura 3-2. Profilul afinității față de oxigen al hemoglobinei și mioglobinei, cu o ilustrare a echilibrului chimic implicat (deoxy – oxi).

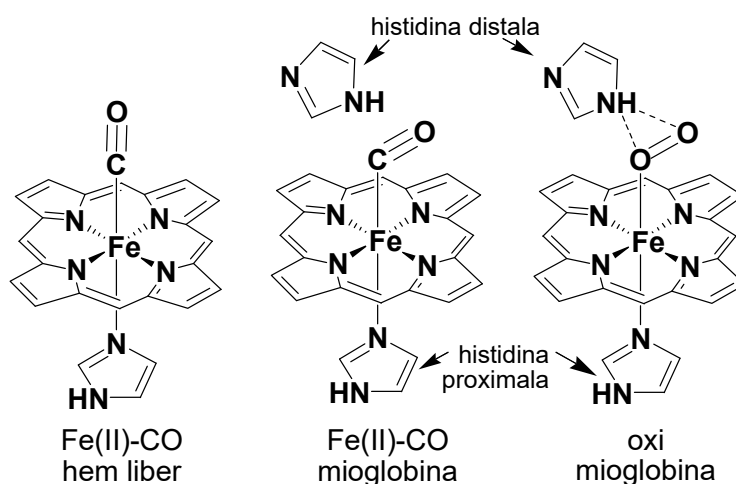
Pentru a înțelege mecanismul prin care structura tetramerică poate afecta afinitatea față de oxigen a hemoglobinei, ne vom întoarce la centrul activ, urmărind efectele legării oxigenului molecular. În proporție de peste 90%, fierul globinelor se găsește *in vivo* în două forme, ambele în starea de oxidare formală  $Fe^{2+}$ : pentacoordinată, așa cum a fost descrisă mai sus (numită tradițional „deoxy”) și respectiv hexacoordinată purtând ca al șaselea ligand o moleculă de oxigen (formă tradițional numită „oxi”). În forma deoxy sistemul de liganzi din jurul fierului este asimetric: fierul plasat în centrul porfirinei are ca ligand axial doar histidina proximală, în timp ce în poziție trans față de aceasta nu există vreun ligand. Această asimetrie face ca fierul, în loc să fie plasat exact în planul definit de porfirină, să coboare în afara acestui plan înspre histidina proximală, cu care este angajat în legătură chimică. Un argument în plus pentru ca fierul să părăsească planul porfirinei este și faptul că el are o configurație electronică de spin înalt, ceea ce înseamnă că cei 6 electroni d ai săi sunt astfel aranjați încât 4 dintre ei rămân neîmperecheați. Sistemele de spin înalt au prin definiție un volum al norului electronic mai mare decât al celor de spin jos, și prin urmare și acesta este un motiv pentru care fierul să se afle în afara planului porfirinei în forma deoxy, evitând astfel constrângerile sterice din centrul sistemului porfirinic. La apariția moleculei de oxigen ca al șaselea ligand, se stabilește o simetrie

între cele două fețe ale hemului: de ambele părți se găsește câte un ligand al fierului. În plus, acest al șaselea ligand, care formează o legătură puternică la fier, duce la trecerea metalului la starea de spin jos (0 electroni neîmperecheați), care are un volum al norului electronic mai mic decât cea de spin înalt al formei deoxi. Aceste două elemente (volumul norului electronic și apariția unui ligand suplimentar trans față de histidină) anulează motivele pentru care fierul era plasat în afara planului porfirinei în forma deoxi, și provoacă prin urmare deplasarea fierului dinspre histidina proximală înapoi către planul porfirinei, în care metalul va rămâne atâta vreme cât oxigenul rămâne legat la el. Această deplasare a fierului nu are o importanță deosebită în cazul mioglobinei; însă este la originea aspectului sigmoidal al curbei de legare a oxigenului la hemoglobină. Astfel, mișcarea fierului înspre planul porfirinei antrenează și o mișcare a catenei laterale a histidinei proximale, care urmează fierul fiind angrenată în legătură coordinativă cu acesta. La rândul ei, catena laterală a histidinei proximale nu se poate deplasa decât odată cu întregul fragment de helix  $\alpha$  de care ea este atașată, ceea ce în continuare antrenează modificări subtile ale structurii restului lanțului polipeptidic. Mai mult, aceste modificări sunt resimțite în lanțurile polipeptidice vecine din cadrul tetramerului de hemoglobină. Se pune întrebarea cum este posibil ca simpla legare a unei molecule mici ca  $O_2$  să ducă la modificarea, fie ea și subtilă, a structurii întregului lanț polipeptidic și chiar a celor învecinate. În fapt, această deplasare era pregătită din vreme de proteină, care este astfel construită încât să poată adopta două conformații majore: una în care histidina proximală este plasată mai departe, și una în care ea este plasată mai aproape de hem, corespunzând structurilor deoxi și respectiv oxi. Diferența de energie dintre cele două conformații ale proteinei este foarte mică, astfel încât într-adevăr simpla legare a moleculei de oxigen la fier poate într-adevăr provoca trecerea de la o conformație la alta. Semnificația existenței celor două conformații este înțeleasă dacă ne reamintim poziția fierului în fiecare dintre cele două conformații: într-una dintre conformații el este plasat mai aproape de poziția în care va fi legat oxigenul decât în cealaltă conformație; acest fapt face ca legarea oxigenului să fie mai facilă într-o conformație decât în cealaltă, sau, cu alte cuvinte, cele două conformații au afinități diferite față de oxigen. Aceste două conformații sunt denumite în mod tradițional T și respectiv R (Tensionată și respectiv Relaxată).

Natura legăturii chimice dintre fierul globinelor și oxigenul molecular a suscitat multă vreme dezbateri. Unul dintre cele mai puternice argumente luate în considerare a fost spectrul vibrațional (de rezonanță Raman) al oxi-hemoglobinei; în acesta, frecvența de vibrație a legăturii oxigen-oxigen din ligandul  $O_2$  coordonat la fier se remarcă printr-o valoare mult mai mică decât cea din oxigenul molecular și foarte similară cu cea din compuși bine caracterizați ca având un ligand superoxo ( $O_2^-$ ) coordonat la un metal. În concordanță cu această situație, spectrul Mössbauer al oxi-hemoglobinei prezintă trăsături clar caracteristice Fe(III) și nu Fe(II). Astfel, se acceptă azi în general că la legarea  $O_2$  de Fe(II) din hemoglobină are loc un transfer cel puțin parțial de sarcină de la fier la oxigen, astfel încât complexul este descris ca având un caracter puternic de Fe(III)-superoxo. Fenomenul acesta, prin care o moleculă adoptă două sau mai multe structuri electronice care diferă prin poziția unuia sau mai multor electroni, este denumit electromerie (sau izomerie redox), prin analogie cu mai cunoscutul fenomen de tautomerie din chimia organică. În cazul de față, forma oxi a hemoglobinei poate accesa doi electromeri: unul descriabil ca Fe(II) coordonat cu oxigen molecular, și unul descriabil ca Fe(III) coordonat cu superoxid. Structura reală a sistemului este acceptată ca fiind intermediară între acești doi electromeri, dar cu o contribuție mai importantă din partea celui Fe(III)-superoxo. Este însă

important de subliniat că la eliberarea oxigenului de pe fier, cei doi parteneri de legătură chimică își refac structurile inițiale – și anume Fe(II) și respectiv oxigen molecular.

Pe lângă oxigenul molecular, hemoglobina interacționează *in vivo* și cu multe alte molecule mici sau ioni. Una dintre cele mai cunoscute astfel de molecule este monoxidul de carbon, prezent ca agent de poluare în atmosferă îndeosebi ca rezultat al unor arderi incomplete; monoxidul de carbon este produs, în concentrații foarte mici și prin urmare non-toxice, chiar în interiorul organismului nostru, în prima etapa a ciclului catalitic al hem-oxigenazei (enzimă care distruge hemul), și rezultate experimentale mai recente atestă posibile aplicații terapeutice ale compușilor care eliberează CO în concentrații non-toxice în organism. Toxicitatea CO se explică prin faptul că acesta prezintă o afinitate remarcabilă pentru Fe(II) în principiu și pentru cel hemic în particular; această afinitate este mult mai mare decât cea pentru oxigen, ceea ce face ca CO să fie preferat de hemoglobină în detrimentul oxigenului molecular, și legat puternic, chiar și atunci când este prezent în concentrații mult mai mici decât oxigenul molecular. Stabilitatea aducțiilor Fe(II)-CO ai globinelor este în fapt atât de mare, încât o dată legat CO acesta nu mai este eliberat de pe hemoglobină, împiedicând-o astfel să își exercite funcția fiziologică de transport a oxigenului molecular. Globinele limitează acest efect toxic al monoxidului de carbon prin două mecanisme, ambele implicând histidina distală. Așa cum se arată în Figura 3-3, aducții Fe-C≡O preferă o geometrie liniară, ceea ce aduce monoxidul de carbon în ușor conflict steric cu histidina distală, spre deosebire de molecula de oxigen, al cărui aduct Fe-O=O adoptă o geometrie non-liniară, cu cel de-al treilea atom așezat mai departe de histidina distală și astfel evitând conflictul steric. Pe de altă parte, așa cum s-a arătat mai sus, în aductul oxigenului ligandul O<sub>2</sub> poartă un puternic caracter de superoxid, cu un exces de sarcină electrică negativă pe ambii atomi de oxigen. Această sarcină negativă permite ligandului superoxo să stabilească o legătură de hidrogen cu histidina distală; pe de altă parte, monoxidul de carbon, incapabil de electromerie, nu poartă o sarcină electrică netă și prin urmare este mult mai puțin capabil să formeze o legătură de hidrogen puternică împreună cu histidina distală. Astfel, factorul steric și cel implicând legătura de hidrogen contribuie la o destabilizare parțială a aductului Fe(II)-CO în comparație cu cel oxigen.



**Figura 3-3. Structurile aducțiilor hemului feros cu monoxidul de carbon și respectiv oxigenul, ilustrând tendința de conflict steric adusă de histidina distală (His E7) din globine. Este important însă de subliniat că în realitate chiar și în globine aductul Fe(II)-CO rămâne liniar – figura ilustrând doar tendința histidinei distale de a impune o altfel de geometrie.**

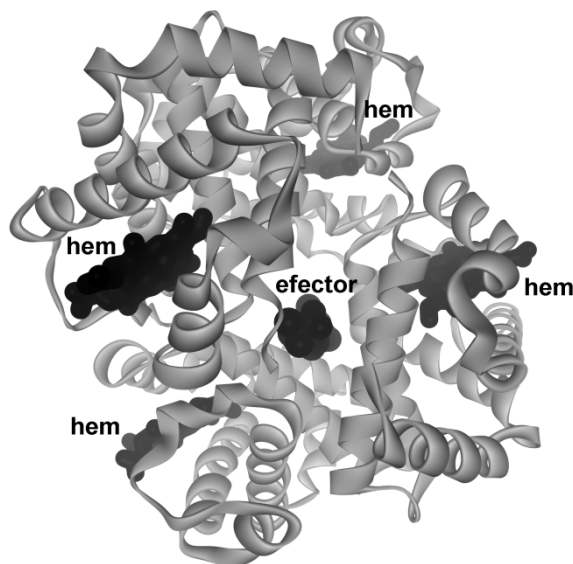
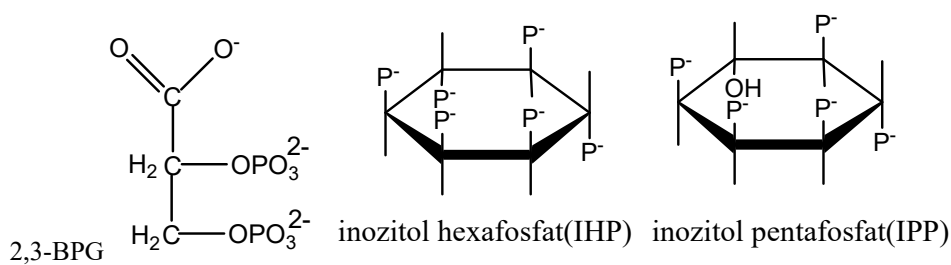
O a doua moleculă importantă cu care hemoglobina interacționează *in vivo* este CO<sub>2</sub>. Spre deosebire de O<sub>2</sub> și CO, dioxidul de carbon se leagă la hemoglobină nu la fier ci la atomul de azot al unui aminoacid – și anume gruparea amino N-terminală (primul aminoacid din secvență); reacția este ilustrată în Figura 3-4. Acest fenomen are importanță întrucât permite transportul CO<sub>2</sub> către plămâni de la țesuturile în care acesta apare ca produs al arderilor celulare.



**Figura 3-4. Reacția de legare a CO<sub>2</sub> la hemoglobină**

Este important de notat că legarea dioxidului de carbon are ca efect o modificare locală a structurii proteinei, ce duce la o ușoară scădere a afinității față de oxigen. Efectul este că în zona țesuturilor bogate în CO<sub>2</sub>, și care așadar sunt foarte active metabolic, deci necesită cantități sporite de O<sub>2</sub>, hemoglobina, ca urmare a legării CO<sub>2</sub>, eliberează mai mult O<sub>2</sub> așa cum de fapt și necesită țesutul respectiv. O modalitate indirectă prin care CO<sub>2</sub> interacționează cu hemoglobina derivă din bine-cunoscuta reacție de hidratare în care dioxidul de carbon este implicat în apă, al cărei produs este acidul carbonic. Astfel, în vecinătatea țesuturilor bogate în CO<sub>2</sub> pH-ul sângelui va scădea ușor, ca efect al producerii de acid carbonic; afinitatea față de oxigen a hemoglobinei este însă dependentă de pH, scăzând la pH acid ca urmare a modificărilor subtile de structură în urma protonării câtorva aminoacizi (acest fenomen este cunoscut sub numele de „efect Bohr”). Astfel, atât legarea directă a CO<sub>2</sub> la hemoglobină cât și schimbarea de pH generată de CO<sub>2</sub>, ambele efecte ale unui necesar sporit de oxigen molecular, duc, prin diminuarea locală a afinității față de oxigen a hemoglobinei, la livrarea de cantități sporite de O<sub>2</sub> țesutului respectiv.

Dioxidul de carbon și protonii au proprietatea de a afecta legarea oxigenului molecular la fier, deși nu interacționează direct cu fierul sau cu liganzii acestuia. Genul acesta de interacțiune, prin care o moleculă A se leagă la o proteina la un anumită locație („situs”) și afectează în acest mod legarea unei alte molecule B la un alt situs al aceleiași proteine, este denumit generic „alosterie”. Molecula A din definiția de mai sus este denumită în acest context „efector alosteric”. Astfel dioxidul de carbon și protonii sunt efectori alosterici pentru legarea oxigenului molecular la fier. Există și alți efectori alosterici cu efecte similare, care au ca trăsătură comună caracterul anionic. Toți aceștia (2,3-bis-fosfo-gliceratul 2,3-BPG, inozitol fosfații, clorura) au un situs de legare bine definit la joncțiunea dintre cele patru subunități ale hemoglobinei, în centrul tetramerului (așa cum se ilustrează în Figura 3-5). Hemoglobine din diverse organisme au afinități diferite față de acești efectori alosterici. Astfel, hemoglobina umană utilizează 2,3-BPG ca efector alosteric și prin urmare celula roșie adăpostește, pe lângă hemoglobină, și cantități importante de 2,3-BPG; pe de altă parte hemoglobina bovină nu este sensibilă la 2,3-BPG și folosește în schimb doar ionul clorură. Mai mult, la om, hemoglobina produsă în adult diferă ușor, la nivelul structurii primare, de cea produsă în făt în interiorul uterului mamei; această diferență în structura primară duce la o ușoară diferență în afinitatea față de 2,3-BPG –suficient pentru ca hemoglobina fetală (HbF) să manifeste o afinitate mai mare față de oxigen decât hemoglobina adultă, ceea ce permite transferul eficient de oxigen din sângele mamei către sângele fătului.



**Figura 3-5. Structurile unor efectori alosterici cu caracter anionic ai hemoglobinei și situsul lor de legare.**

O reacție importantă a globinelor este cea de autooxidare. În principiu, aductul oxi al unui hem, fie el înglobat într-o proteină sau liber în soluție, are la dispoziție două căi de descompunere: una, care predomină în globine, implică eliberarea de oxigen molecular de pe Fe(II). Cea de-a doua cale de reacție, denumită autooxidare, implică eliberarea de superoxid,  $\text{O}_2^-$ , lăsând în urmă Fe(III). Hemul liber, în special când este dizolvat în solvenți polari, are o preferință puternică pentru reacția de autooxidare. Dimpotrivă, mediul puternic hidrofob creat de globină în jurul hemului său defavorizează puternic separarea de sarcină electrică implicată de reacția de autooxidare și, dimpotrivă, favorizează eliberarea ligandului neutru din punct de vedere electric,  $\text{O}_2$ . Cu toate acestea, reacția de autooxidare nu este evitată complet nici în globine. Întrucât forma Fe(III) a globinelor (tradițional numită „met”) nu este capabilă să lege molecula de oxigen, ea este inutilă organismului (după cum se va vedea mai jos, ea este, din alte motive, chiar profund toxică) și prin urmare este necesară transformarea ei înapoi la Fe(II), printr-o reacție chimică de reducere. În celula roșie există o enzimă dedicată acestui proces de reducere a met-hemoglobinei la deoxi-hemoglobină (Fe(III) la Fe(II)), enzimă denumită methemoglobin reductază; datorită acțiunii acestei enzime, nivelul de Fe(III)-hemoglobina este menținut într-un individ sănătos la maximum 0.1% din totalul de hemoglobină. Deficiențe genetice la nivelul methemoglobin reductazei pot duce la un exces de methemoglobină în sânge, ceea ce va rezulta într-un aspect albastrui al sângelui, observabil în cazuri mai extreme inclusiv la nivelul pielii. Această situație a constituit un moment important în medicină, fiind primul caz în care o condiție medicală (culoarea nefirească de albastră a pielii unor pacienți) a fost explicată printr-o mutație genetică bine definită, la nivelul unei singure enzime. Agenți

chimici, ca de exemplu nitriții prezenți ca poluanți în apa de băut, pot avea de asemenea un efect de inducere temporară a autooxidării, ducând spre exemplu la „sindromul copiilor albaștri” (observat la nou-născuți a căror alimentație a fost afectată de ape bogate în nitriți).

O altă clasă de molecule cu care globinele interacționează *in vivo* sunt peroxizii. Aceștia sunt prezenți în sânge și au proprietatea de a reacționa cu Fe(III), inclusiv cel din met-hemoglobină, într-o reacție ce produce radicali liberi și duce la degradarea ireversibilă a globinei. Producții de degradare a hemoglobinei sunt detectabili în sângele unui individ sănătos și apar în concentrații crescute în condiții de efort fizic sau în anumite stări de boală.

Monoxidul de azot, NO, este un gaz extrem de toxic și instabil, datorită în mare parte caracterului său de radical liber. Multe organisme și-au construit seturi de enzime specializate în lupta împotriva NO. A fost prin urmare o surpriză atunci când s-a descoperit ca NO este generat în pereții vaselor de sânge, la concentrații foarte mici, ca mesager ce controlează contracția mușchilor netezi din jurul vasului de sânge și prin urmare controlează presiunea sângelui. Oxi-hemoglobina reacționează extrem de rapid cu NO, fapt explicabil prin caracterul Fe(III)-superoxo al oxi-Hb; superoxidul, ca și NO, are un caracter de radical liber, ceea ce duce la o reacție foarte facilă în care electronii neîmperecheați ai NO și  $O_2$  formează o legătură chimică, rezultând un aduct Fe(III)-O-O-NO- (peroxinitrito) care se izomerizează foarte rapid la Fe(III)-azotat. Dacă în sângele uman această reacție este evitată în condiții normale prin faptul că NO se găsește doar în concentrații foarte mici și doar în apropierea peretelui vasului de sânge în timp ce hemoglobina este protejată în interiorul celulei roșii, există organisme în care rolul hemoglobinei este tocmai de a reacționa cu NO în maniera descrisă mai sus. Astfel, organismul unicelular *Escherichia coli* conține o hemoglobină a cărei funcție pare a fi distrugerea monoxidului de azot prin reacție cu forma oxi, cu scopul de a proteja celula în condițiile în care ea ar fi expusă unui exces de NO; întrucât la finalul reacției cu NO fierul globinei se regăsește ca Fe(III), este necesară regenerarea sa la Fe(II) pentru ca ciclul catalitic să se poată relua. Din această cauză în imediata vecinătate a hemului hemoglobinei din *E. coli* proteina conține și o flavină, cu rol de a canaliza electroni către fier și a favoriza re-reducerea lui la finalul ciclului catalitic; proteina aceasta este de altfel denumită chiar „flavohemoglobină”. În alte organisme bacteriene se regăsesc enzime similare ca structură și funcție flavohemoglobinei, dar în care partea flavinică și cea globinică au evoluat ca proteine separate; în acest caz se vorbește despre hemoglobine truncate (tHb).

În strânsă conexiune cu monoxidul de azot, hemoglobina este capabilă să interacționeze și cu azotitul. Deoxi Hb reduce azotitul la NO, în timp ce oxi-Hb suferă o reacție de autooxidare în prezența azotitului. Capacitatea azotitului de a genera NO în sânge prin reacție cu hemoglobina a fost propusă în anii din urmă ca justificare pentru folosirea în scop terapeutic, pentru sistemul cardiovascular, a azotitului.

După cum s-a ilustrat mai sus cu flavohemoglobina și hemoglobinele truncate, familia globinelor se extinde mult dincolo de hemoglobină și mioglobină.<sup>41</sup> Astfel, toate celulele umane conțin, în cantități foarte mici, o globină numită citoglobină, al cărei rol este încă necunoscut. De asemenea, celulele nervoase conțin neuroglobina – o altă proteină cu rol neclar – dar cel mai probabil legat de stresul oxidativ (excesul de agenți oxidanți și radicali liberi). Plantele conțin o globină numită leghemoglobină (particula „leg” provenind de la „leguminos”), al cărei cel mai probabil rol este unul similar cu cel al mioglobinei – de stocare a oxigenului în interiorul celulei. De asemenea, nu număr de alte globine se găsesc în plante (se folosește

generic și termenul de fitoglobine) – nu toate cu rol clar identificat încă.<sup>42</sup> În condițiile în care rudele hemoglobinei din organisme inferioare nu servesc drept transportori de oxigen molecular ci drept enzime redox, este foarte probabil că hemoglobina și mioglobina din animale au evoluat pornind de la sisteme enzimatic care aveau cu totul alte roluri și existau încă dinainte de evoluția atmosferei de la stadiul predominant anaerob la cel bogat în oxigen în care au evoluat animalele.

### 3.2. Hemeritrine

Hemeritrinele servesc drept transportori de oxigen într-o gamă restrânsă de organisme inferioare – ca de exemplu viermi marini. Centrul lor activ, unde are loc legarea oxigenului molecular, conține doi ioni de fier, după cum se ilustrează în Figura 3-6.<sup>21,43–45</sup>

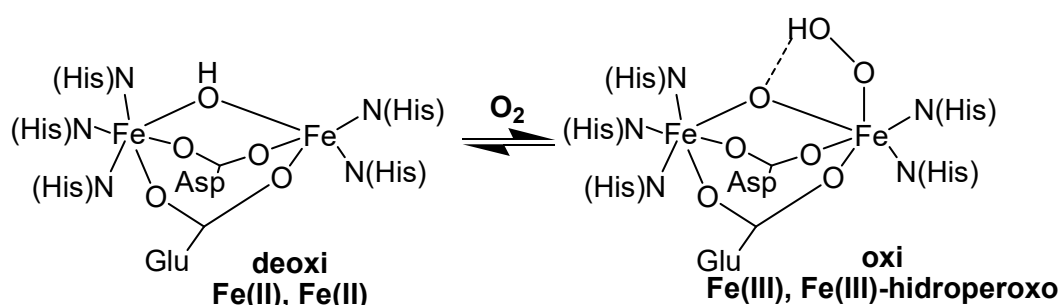


Figura 3-6. Structura centrului activ al hemeritrinelor și reacția de legare a oxigenului la aceasta.

Prin analogie cu hemoglobina, se definesc și aici trei stări posibile ale centrului activ: deoxi (di-feros), oxi (format prin legarea oxigenului molecular la forma deoxi) și met (di-feric). În plus, datorită caracterului bimetalic al centrului activ al hemeritrinei, aici se mai definește și o așa-zisă formă semi-met (sau, „de valență mixtă”), în care unul dintre metale este Fe(II) iar celălalt Fe(III). Ca și în cazul hemoglobinei, măsurătorile Mössbauer au demonstrat ca oxi-hemeritrina conține Fe(III). De data aceasta, fiind vorba de doi ioni Fe(III), rezultă că la legarea moleculei de oxigen de centrul di-feros al hemeritrinei are loc un transfer de *doi* electroni către ligand, care devine astfel peroxid,  $\text{O}_2^{2-}$ . Mai mult, așa cum se vede în Figura 3-6, centrul activ furnizează un proton care stabilizează această formă redusă chimic a ligandului. Măsurătorile vibraționale (spectrul de rezonanță Raman) confirmă existența unei legături mult slăbite între cei doi atomi din ligandul di-oxigenic, în concordanță cu legătura simplă existentă într-un ligand peroxo. Ca și hemoglobina, forma oxi a hemeritrinei este roșie. Natura acestei culori este însă complet diferită: dacă în hemoglobina culoarea este extrem de intensă și datorată exclusiv tranzițiilor electronice de tip  $\pi-\pi^*$  din interiorul porfirinei coordinate la fier, cu coeficienți de extincție de 100000–200000, culoarea formei oxi a hemeritrinei se datorează tranzițiilor electronice de tip LMCT (transfer de sarcină de la ligand la metal), care au coeficienți de extincție de cca 10 ori mai mici decât cele ale porfirinei. Această diferență explică și de ce forma deoxi a hemoglobinei este și ea colorată intens, în timp ce forma deoxi a hemeritrinei, în care metalul este redus, Fe(II), și prin urmare mult mai puțin dispus să se angajeze în tranziții LMCT, este incoloră.



Hemeritrinele diferă de hemoglobine și prin structura matricii proteice, deși în ambele predomină structura de tip helix  $\alpha$  iar masele moleculare ale monomerilor sunt apropiate. Dacă hemoglobina se prezintă sub formă de monomer, dimer, tetramer sau oligomer cu până la 180 de subunități, hemeritrina se prezintă organizată sub formă de monomer sau oligomer cu 2,3,4 sau 8 subunități.

### 3.3. Hemocianine

Hemocianinele servesc drept transportori de oxigen în anumite tipuri de crustacee, și diferă de hemeritrine și globine din două puncte de vedere: centrul activ conține aici cupru în loc de fier, iar în matricea proteică domină acum foile pliate  $\beta$ ; de asemenea, masa moleculară este de cca 4 ori mai mare decât la globine.

Reacția de legare a oxigenului molecular la centrul activ din hemocianine este ilustrată în Figura 3-7. Centrul activ este binuclear ca în cazul hemeritrinei, cu forma deoxi conținând Cu(I) și cea oxi conținând Cu(II); la fel ca în cazul hemeritrinei, aceasta implică transformarea reversibilă a moleculei de oxigen în peroxid la legarea de centrul metalic; de data aceasta însă, peroxidul este legat în punte bidentată, așa cum se vede în Figura 3-7. Acest mod de legare, în care ambii atomi de oxigen interacționează concomitent cu două metale, duce la o slăbire semnificativă a legăturii oxigen-oxigen, fapt confirmat de spectrul vibrațional al oxi-hemocianinei, care arată o frecvență de vibrație mai mică (și prin urmare o legătură oxigen-oxigen mai slabă) decât în majoritatea complexelor metal-peroxo.

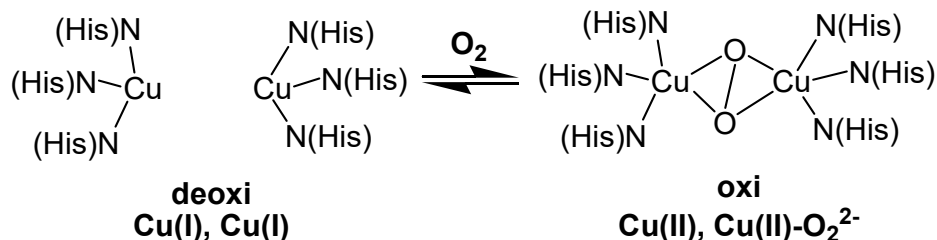


Figura 3-7. Structura centrului activ al hemocianinelor și reacția de legare a oxigenului la aceasta.

### 3.4. Proteine-senzor pentru $\text{O}_2$ și molecule înrudite

După cum s-a văzut mai sus, legarea  $\text{O}_2$  la hemoglobină declanșează schimbări structurale ce se propagă la distanțe mari în componenta polipeptidică a acestei metaloproteine. De astfel de schimbări profită hemoproteine care au ca rol detectarea moleculei de oxigen: schimbările structurale din interiorul unor astfel de proteine vor fi transmise unor alte componente celulare, semnalând prezența  $\text{O}_2$  în mediu. Astfel, proteina FixL este produsă în bacterii fixatoare de azot, cu rolul de a regla nivelul de producere tocmai al genelor implicate în transformarea  $\text{N}_2$  în  $\text{NH}_3$  (aceste proteine fiind foarte sensibile la oxigen). În alte bacterii se întâlnește hemoproteina HemAT, care are un domeniu înrudit structural cu globinele, și care are rolul de a detecta oxigenul molecular ca parte a unui mecanism chemotactic (prin care bacteria alege să se deplaseze în mediu de-a lungul unui gradient de concentrație de  $\text{O}_2$ ).

Guanilat ciclaza solubilă (sGC) are și ea un domeniu hemoproteic cu rol de senzor pentru un gaz diatomic – monoxidul de azot. NO însuși este o moleculă-mesager, iar legarea sa la sGC declanșează modificări structurale care, într-un alt domeniu al sGC, duc la sinteza unei alte molecule-mesager, cGMP (guanozin monofosfat ciclic), cu roluri în relaxarea mușchilor netezi sau în transmiterea impulsurilor nervoase. Capacitatea NO de a declanșa dilatarea vasului sanguin și prin urmare un aflux local mărit de sânge a fost exploatată de unele insecte care se hrănesc cu sângele animalelor prin mușcătură. Aceste insecte eliberează în timpul mușcăturii o hemoproteină care transportă NO legat la Fe, și care eliberează acest gaz în sângele victimei, permițând hrănirea mai eficientă a insectei.

CooA este o hemoproteină întâlnită în bacterii capabile de a folosi monoxidul de carbon ca sursă de energie (spre deosebire, de exemplu, de oameni, care folosesc pentru acest scop mult mai complexe clase de molecule – lipide, glucide, proteine). Această proteină servește ca senzor pentru CO.

DcrH este singurul senzor pentru gaze de natură non-heminică ce a fost descoperit până în prezent. Funcția sa este similară cu cea a HemAT, cu deosebirea, la nivel structural, că DcrH leagă molecula de oxigen într-un domeniu înrudit cu hemeritrina atât din punct de vedere al matricii proteice cât și al centrului activ di-feros.<sup>46</sup>

## 4. Proteine care activează oxigenul molecular

Reacția dintre oxigenul molecular și o substanță organică este în general puternic exotermă. Totuși, aproape toate moleculele organice sunt stabile în prezența  $O_2$ . Oxigenul molecular prezintă doi electroni neîmperecheați, în timp ce substanțele organice sunt în general diamagnetice iar produșii lor de „ardere” ( $CO_2$  și apa, în ultimă instanță) sunt de asemenea diamagnetici. Aceasta implică o reacție, între  $O_2$  și compusul organic, în care numărul total de electroni neîmperecheați se schimbă de la 2 la 0; o astfel de schimbare este puternic defavorizată de regulile mecanicii cuantice și aduce o importantă barieră cinetică în calea reacției. Pe de altă parte, sistemele vii au nevoie, din diverse motive, să utilizeze oxigenul molecular pentru a oxida selectiv anumite componente celulare. Pentru acest scop sunt adesea folosite metaloenzyme, care, după cum s-a văzut în Capitolul 3, pot folosi metalul pentru a schimba profund structura electronică a ligandului  $O_2$  (transformându-l spre exemplu în superoxid sau peroxid) și a evita astfel problema barierei cinetice din reacția cu substanța organică.

În acest capitol se vor discuta reacțiile în care metaloproteinele atrag oxigenul molecular și congenerii acestuia – superoxidul și peroxidul. O vedere de ansamblu a acestor procese este prezentată în Figura 4-1.

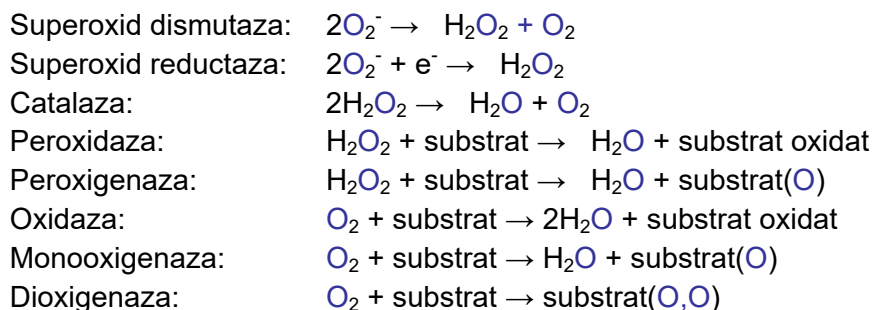


Figura 4-1. Definițiile câtorva tipuri de reactivitate implicând metaloproteine și oxigenul molecular ori forme parțial reduse ale acestuia.

### 4.1. Superoxid dismutaze

Așa cum se arată în Figura 4-1, superoxid dismutazele (SOD) catalizează disproporționarea superoxidului,  $O_2^-$ , la peroxid și oxigen molecular. Rolul lor este unul protectiv, superoxidul fiind un radical liber și prin urmare capabil de a modifica extrem de rapid și în mod nedorit structurile multor compuși din interiorul unui organism viu. Alături de superoxid, alți agenți deosebit de periculoși sunt congenerii acestuia, apa oxigenată, peroxizii organici, sau oxigenul singlet (starea excitată a  $O_2$ , în care nu mai există electroni neîmperecheați. Alături de radicalii liberi, această serie de substanțe sunt responsabile pentru ceea ce se numește generic stres oxidativ. O serie dintre enzimele discutate în acest capitol (SOD, dar, după cum se va vedea, și altele) au ca funcție *in vivo* tocmai combaterea stresului oxidativ.

Toate SOD folosesc un metal activ redox la situsul catalitic; schema generală a mecanismului oricăreia dintre SOD este prezentată în Figura 4-2. Punctul de plecare este forma redusă a centrului metalic,  $M^{n+}$  (în funcție de metal, acesta poate fi Ni(II), Fe(II), Mn(II) sau Cu(I)). Metalul reacționează cu o primă moleculă de superoxid, printr-un mecanism încă incomplet elucidat; astfel, este posibilă în principiu fie oxidarea directă a metalului la  $M^{n+1}$  (Ni(III), Fe(III), Mn(III), Cu(II)) fără a se forma o legătură coordinativă între superoxid și metal – superoxidul fiind astfel redus la peroxid, fie formarea unui complex superoxid-metal,  $M^{n+}-O_2^-$ , care va prezenta un fenomen de electromerie foarte similar celui întâlnit la legarea oxigenului de fierul din globine, astfel, complexii Ni(II)-superoxo, Fe(II)-superoxo, Mn(II)-superoxo sau Cu(II)-superoxo ar putea fi descriși și ca aducți ai peroxidului cu Ni(III), Fe(III), Mn(III) sau Cu(II). Prin protonarea unor astfel de complexi se produce  $H_2O_2$ . Indiferent de mecanism, la finalul acestei prime etape a ciclului catalitic centrul metalic se regăsește în forma oxidată,  $M^{n+1}$ . Această formă reacționează cu o a doua moleculă de superoxid, din nou fiind posibile două mecanisme: unul de transfer electronic pur, fără formare de legătura metal-superoxid, și unul care implică formarea unui aduct  $M^{n+1}-O_2^-$ , capabil de asemenea de electromerie: spre exemplu, Ni(III)-superoxo devine astfel Ni(II) coordinat cu oxigen molecular; descompunerea acestuia din urmă readuce metalul la starea inițială, redusă, eliberând o moleculă de oxigen și încheind astfel ciclul catalitic.

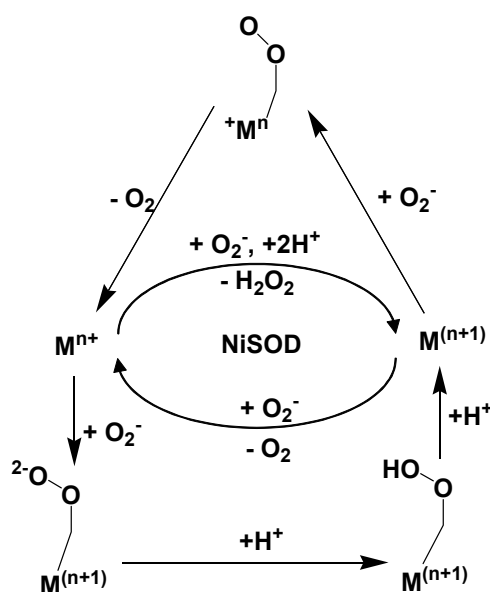


Figura 4-2. Mecanisme propuse pentru superoxid dismutaze.

Figura 4-3 ilustrează structurile situsurilor active ale principalelor trei tipuri de superoxid dismutaze. Ni-SOD prezintă un mod neobișnuit de coordinare, în care unul dintre liganzi este o grupare amido ( $-CO-NH-$ ) deprotonată la azot; în general sunt extrem de rare cazurile din biochimie în care o legătură peptidică se deprotonează în condiții fiziologice. Superoxid dismutazele cu Fe și cele cu Mn au situsuri catalitice esențialmente identice, diferind doar metalul; liganzii sunt cei așteptați pentru astfel de metale – histidină, glutamat sau aspartat. Superoxid dismutazele cu cupru prezintă și ele o caracteristică structurală deosebită: deși cuprul este coordinat în mod așteptat, cu trei histidine (liganzi pe baza de azot), sistemul imidazolic al uneia dintre aceste histidine servește drept ligand pentru un al doilea metal, și anume un ion

de Zn(II) – astfel încât enzima este denumită în mod curent Cu,Zn-SOD (superoxid dismutaza cu cupru și zinc). O astfel de legare a histidinei în punte între două metale este unică în aceste enzime și se consideră a avea un rol structural – superoxidul interacționând exclusiv cu cuprul. O trăsătură notabilă a tuturor celor trei clase structurale ilustrate în Figura 4-3 este faptul că metalul nu este saturat coordinativ de către proteină, rămânând poziții libere care fie vor fi păstrate ca atare (ca în cazul Ni-SOD), fie vor fi ocupate de molecule de apă (ca în cazul Cu,Zn-SOD, Fe-SOD sau Mn-SOD). Această caracteristică lasă deschisă posibilitatea legării superoxidului la metal în decursul ciclului catalitic, apa fiind un ligand ușor de înlocuit.<sup>47</sup>

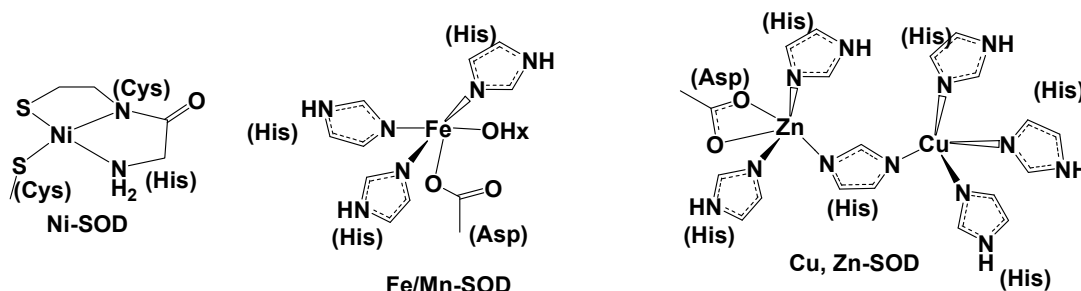


Figura 4-3. Situsurile active ale celor trei tipuri de superoxid dismutaze discutate în text.

## 4.2. Superoxid reductaze

Ca și SOD, și superoxid reductazele (SOR) au un rol protectiv. De data aceasta însă procesul este pur reductiv, singurul produs fiind peroxidul – spre deosebire de SOD unde se producea atât peroxid cât și oxigen molecular. Această diferență se corelează cu faptul că SOR se găsesc exclusiv în organisme anaerobe, în care producerea de  $O_2$  (așa cum fac SOD) ar fi contraproductivă. Ciclul catalitic propus pentru SOR este ilustrat în Figura 4-4. Electronii necesari completării ciclului catalitic sunt furnizați de celulă prin intermediul unor proteine specializate (rubredoxine, a se vedea Capitolul 5).<sup>48-51</sup>

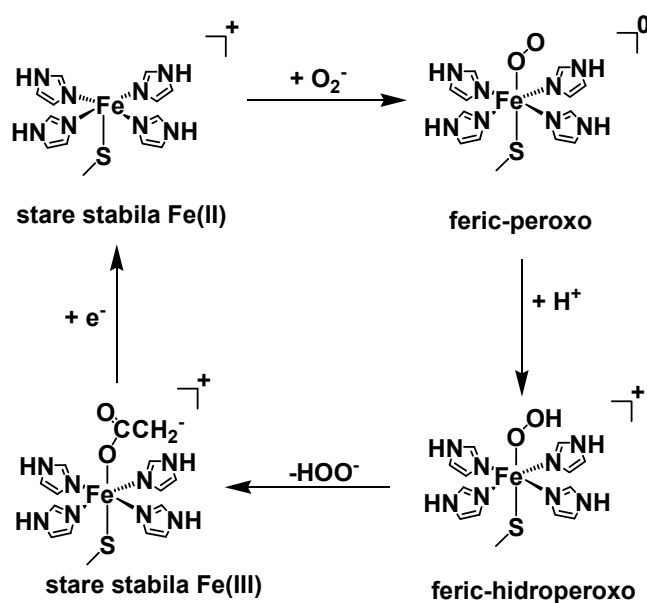


Figura 4-4. Mecanismul de acțiune propus pentru superoxid reductaze.

### 4.3. Peroxidaze

Se cunosc patru tipuri de peroxidaze, în funcție de tipul de centru activ: heminice, cu fier non-heminic, cu vanadiu, și non-metalice (cu seleniu sau sulf). Figura 4-5 prezintă ciclul catalitic al peroxidazelor heminice. Se remarcă formele denumite Compusul I și Compusul II, produse în urma legării peroxidului la fier, și în care fierul are starea de oxidare formală Fe(IV); Compusul I prezintă în plus un cation radical localizat la nivelul porfirinei, astfel încât formal el deține cu doi electroni mai puțin decât forma stabilă ferică. Compusul I este rezultatul clivării heterolitice a legăturii oxigen-oxigen dintr-un aduct al hemului feric cu apa oxigenată, cu eliberarea unei molecule de apă; această reacție implică reorganizarea unor protoni, și prin urmare nu este surprinzător că aminoacizii din vecinătatea celei de-a șasea poziții de coordinare de la fier, acolo unde se leagă apa oxigenată, tind să fie polari sau chiar încărcăți electric – capabili deci de cataliză acido-bazică (histidină, arginină, triptofan, glutamat).<sup>9,14,29,52–63</sup>

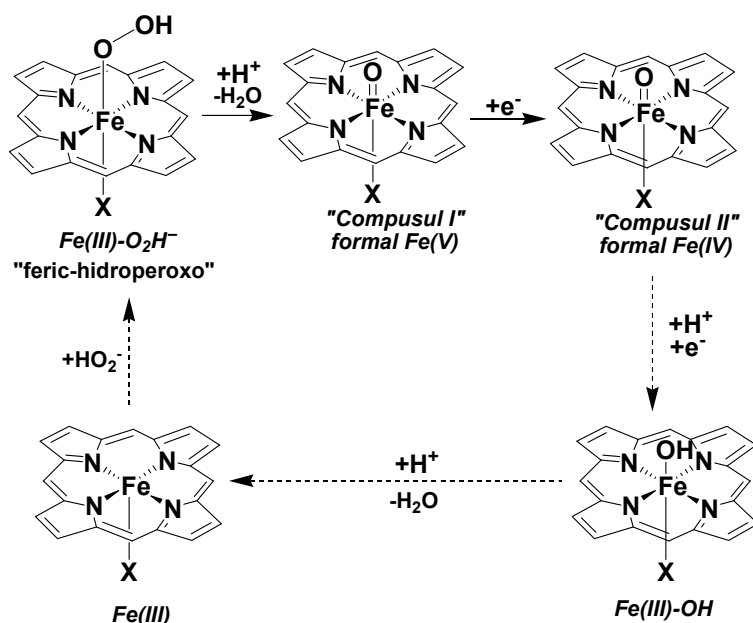


Figura 4-5. Mecanismul de acțiune al peroxidazelor heminice. „X” este de obicei histidina.<sup>53</sup>

Compușii I și II sunt, așa cum este de așteptat, oxidanți foarte puternici. Funcțiile peroxidazelor heminice în fapt implică tocmai oxidarea unor compuși organici sau anorganici de către Compusul I și/sau Compusul II, fie cu scop sintetic fie, așa cum e cazul ascorbat peroxidazei, pentru a proteja organismul prin descompunerea apei oxigenate. În unele cazuri Compusul II nu este parte distinctă a ciclului catalitic: astfel, Compusul I al mieloperoxidazelor și cloroperoxidazelor oxidează clorura într-o reacție ce necesită un transfer simultan de doi electroni, fie pentru a genera  $\text{HOCl}$  cu rol în mecanismul de apărare al organismului (cazul mieloperoxidazei și enzimelor înrudite) fie pentru a genera compuși organohalogenati (cazul cloroperoxidazei). Structural, situsurile active ale peroxidazelor sunt similare celui din globine: prezintă fierul pentacoordinat, cu o poziție liberă pentru legarea apei oxigenate și cu un aminoacid al proteinei coordonat trans față de poziția de legare a apei oxigenate – histidină în majoritatea cazurilor, excepția cea mai importantă constituind-o cloroperoxidaza, care are ca ligand axial cisteinatul.<sup>56</sup>

Peroxidazele cu vanadiu au o funcție de haloperoxidaze (asemeni cloroperoxidazei); structura situsului activ este ilustrată în Figura 4-6, iar mecanismul este foarte diferit de cel al peroxidazelor heminice: cel mai probabil el implică reacția halogenurii direct cu un aduct peroxo al vanadiului – metalul fiind încă de la început în starea de oxidare maxim accesibilă.

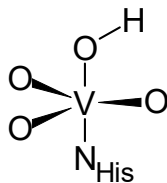


Figura 4-6. Situsul activ al peroxidazelor cu vanadiu.

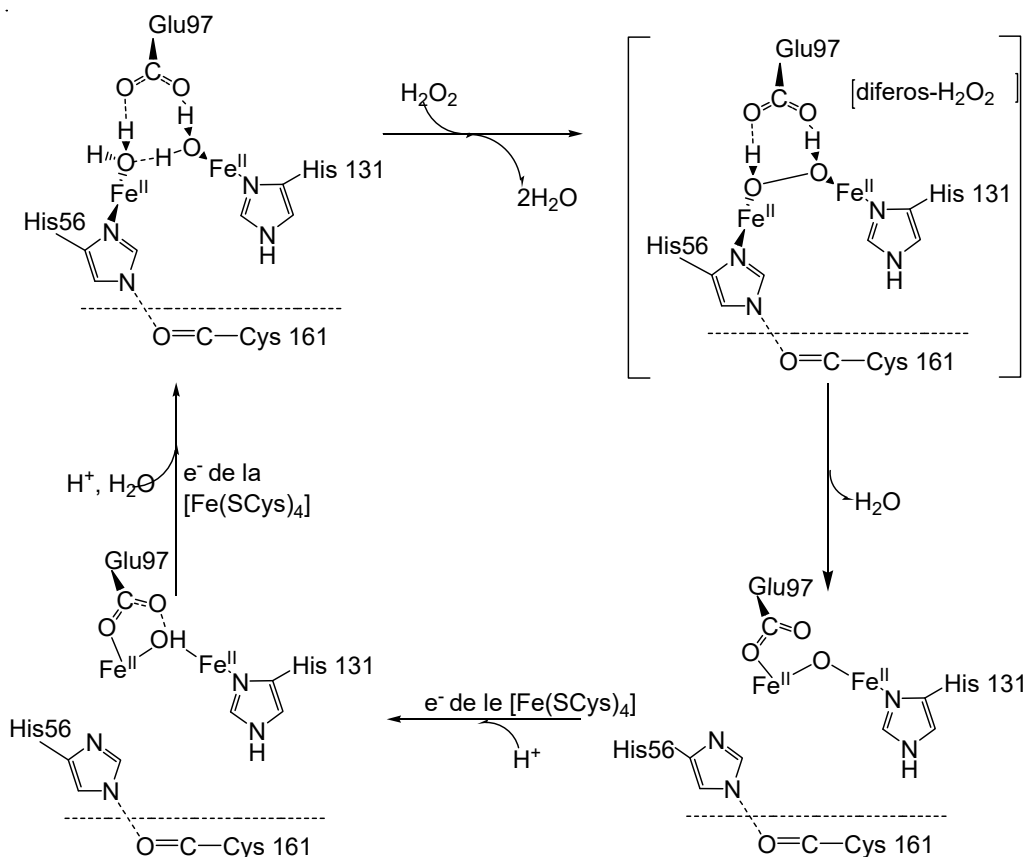


Figura 4-7. Mecanismul de acțiune al peroxidazelor non-heminice.<sup>14</sup>

Peroxidazele cu fier non-hemic (rubreritrine și rudele acestora, ca nigeritrina) au un rol protector, fiind adesea întâlnite în tandem cu SOR în aceleași tipuri de organisme anaerobe. Centrul activ este asemănător celui din hemeritrine, cu deosebirea că ponderea liganzilor pe bază de azot este aici mai mică decât în hemeritrină. Mecanismul, ilustrat în Figura 4-7, este drastic diferit de cel al peroxidazelor heminice: se pornește de la Fe(II), ceea ce în contextul în care sunt prezenți doi ioni metalici înseamnă că legarea peroxidului, care la peroxidazele hemo-proteice ducea de la Fe(III) la (formal) Fe(V) (Compusul I), duce în rubreritrine de la di-Fe(II) la di-Fe(III). Acest mecanism evită formarea de oxidanți puternici de genul Compusului I sau al Compusului II, ceea ce pentru o enzimă cu rol antioxidant, protectiv, constituie un avantaj. Structural, rubreritrinele prezintă o trăsătură remarcabilă, prin aceea că unul dintre cei doi ioni

de fier își schimbă poziția în spațiu de două ori pe parcursul fiecărui ciclu catalitic, călătorind câte  $\sim 3$  Å de fiecare dată; principala diferență dintre cele două poziții ale sale în spațiu constă în înlocuirea unuia dintre liganzii metalului: o histidină (ligand mai moale), preferată în forma feroasă, este pierdută ca ligand în forma ferică, apărând în schimb un glutamat (ligand mai dur, așa cum și Fe(III) este mai dur decât Fe(II)).

Peroxidazele non-metalice prezintă centri activi pe bază de seleniu sau sulf, care ciclează între formele –S-S- (oxidată) și –SH HS- (redușă cu doi electroni). Rolul lor este protectiv, de distrugere a peroxidului, electronii fiind furnizați de compuși tiolici de masă moleculară mică, de tipul cisteinei sau al peptidei pe bază de cisteină, glutationul.

## 4.4. Catalaze

Cele mai multe catalaze funcționează după un principiu și folosind un situs activ foarte similar peroxidazelor, așa cum se ilustrează în Figura 4-8. Astfel, la un hem feric, coordinat axial de un tirozinat (în locul cisteinului sau histidinei din peroxidaze) are loc legarea apei oxigenate, care duce la formarea unui Compus I. În pasul următor din ciclul catalitic o a doua moleculă de apă oxigenată este oxidată de Compusul I la  $O_2$ , fierul revenind la Fe(III). Funcția unei astfel de enzime este de protecție împotriva apei oxigenate. O clasă mai recent descoperită de catalaze prezintă un centru activ binuclear de mangan, a cărui formă Mn(IV)-Mn(IV) este probabil responsabilă de oxidarea celei de-a doua molecule de apă oxigenată.

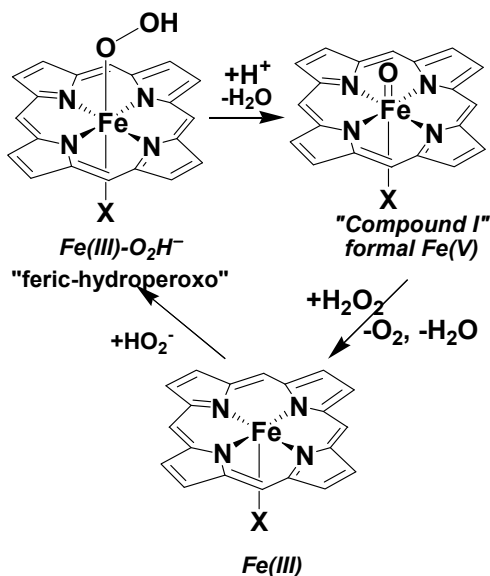


Figura 4-8. Mecanismul de acțiune al catalazelor.

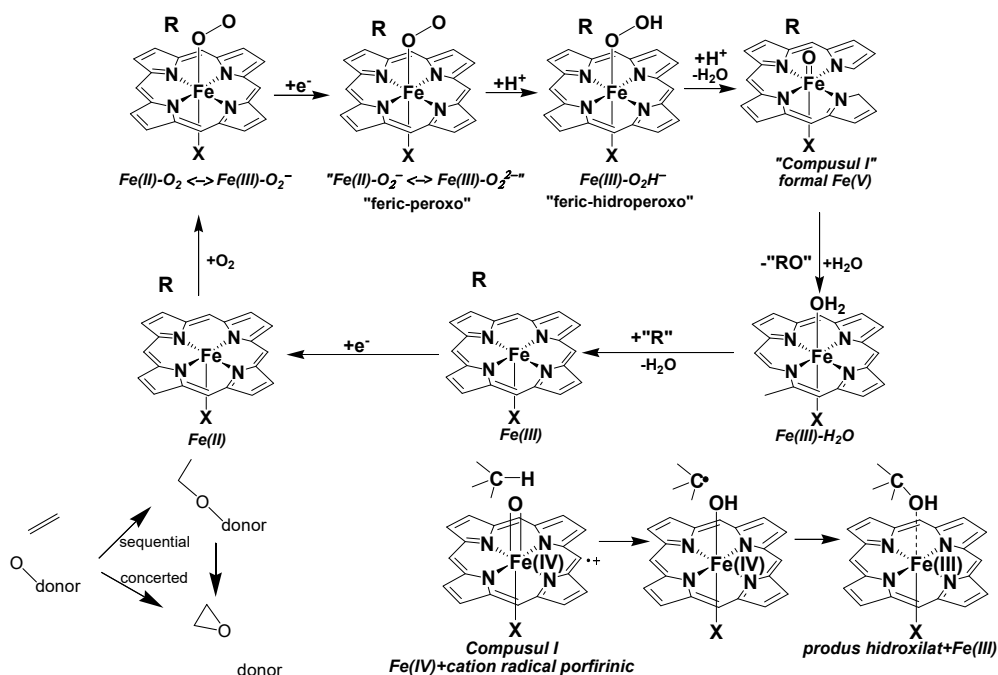
## 4.5. Oxigenaze

### 4.5.1. Monooxigenaze heminice – citocromii P450

Citocromii P450 catalizează inserarea unui atom de oxigen din molecula  $O_2$  în diverși compuși organici. Rolurile lor variază, de la unul sintetic, în care se caută producerea unui compus util, la unul de detoxificare, în care substanțele străine organismului („xenobiotice”) sunt modificate chimic pentru a le facilita eliminarea din organism sau a le limita toxicitatea.



Situsul activ este similar celui din cloroperoxidazele discutate mai sus – un hem coordinat axial de cisteinat; în poziție trans față de cisteinat se găsește în forma stabilă, ferică, o moleculă de apă. O diferență importantă este că în P450 hemul se situează într-un mediu mult mai hidrofob decât în cloroperoxidaze. Ciclul catalitic (Figura 4-9) este inițiat de legarea unei molecule de substrat în vecinătatea apei coordinate la fier. Acest pas duce, prin impedimentele sterice aduse și prin modificarea polarității locale a mediului în cavitatea de deasupra hemului, la expulzarea moleculei de apă coordinate la fier, lăsând metalul pentacoordinat. Ca urmare a slăbirii câmpului de liganzi prin plecarea apei, se modifică starea de spin a fierului, de la  $S=1/2$  (dublet) la  $S=5/2$  (sextet). Aceste schimbări aduc și modificarea potențialului redox al metalului, care devine mai ușor de redus, acceptând un electron adus de o proteină specializată (citocrom P450 reductaza). Forma Fe(II) produsă în acest fel va lega imediat oxigenul molecular, asemeni globinelor, rezultând un aduct descriptibil ca Fe(II)-oxi sau Fe(III)-superoxo. Spre deosebire de globine, forma oxi a citocromilor P450 suferă imediat o reacție de reducere mono-electronică, produsul fiind descriptibil ca Fe(II)-peroxo sau Fe(III)-peroxo. Specia peroxo este extrem de bazică, protonându-se foarte eficient (în unele cazuri fenomenul nu poate fi oprit nici la 4 K), rezultatul fiind cel mai probabil un Compus I (încă nedetectat însă), care apoi își inserează atomul de oxigen în substratul organic fie prin transfer direct, fie prin extragerea unui atom de hidrogen din substrat, urmată de atașarea atomului de oxigen în locul din care a fost extras hidrogenul, așa cum se ilustrează în Figura 4-9. Este important de notat că toți pașii din aval de pasul reductiv de la Fe(III) la Fe(II) sunt foarte rapizi și favorabili termodinamic; dar că ei nu pot avea loc în absența substratului, care este cel responsabil pentru eliminarea moleculei de apă inițial legate la Fe(III); în acest fel se garantează ca nu se va putea produce Compusul I decât în condițiile în care ținta sa (molecula de substrat) este deja prezentă; în absența unui astfel mecanism de siguranță, ar exista riscul de producere a Compusului I în mod necontrolat, cu efecte distructive nedorite.



**Figura 4-9. Ciclul catalitic al citocromilor P450; „R” este un substrat organic oarecare. Partea de jos a figurii ilustrează detalii mecanistice ale producerii speciei „RO” pentru cazurile în care R reactionează la nivelul unei legături duble carbon-carbon sau la nivelul unei legături oxigen-oxigen.**

### 4.5.2. Oxigenaze cu fier non-heminic

Oxigenazele cu fier non-heminic prezintă o problemă interesantă, în măsura în care ele urmează cicluri catalitice similare celor cu fier heminic de tip P450: în absența porfirinei coordonate la fier, echivalentul Compusului I ar trebui să conțină Fe(V) fără a mai putea delocaliza una dintre sarcinile pozitive în exces către liganzi.

#### *Dioxigenaze de tip Rieske*

Dioxigenazele din această clasă sunt caracterizate de prezența în apropierea centrului activ a unui al doilea centru metalic, specializat în transfer electronic, denumit Rieske (a se vedea Capitolul 5 pentru detalii asupra acestei denumiri). Substraturile lor tind să fie compuși aromatici, oxidați în general la dioli (o excepție în privința naturii produsului este benzen dioxigenaza, care suferă o reacție de mono-oxigenare în primă instanță). Ciclul catalitic propus pentru aceste enzime este prezentat în Figura 4-10. Este încă neclar care este specia responsabilă de reacția directă cu substratul – principalii candidați fiind Fe(V) sau Fe(III)-hidroperoxo.

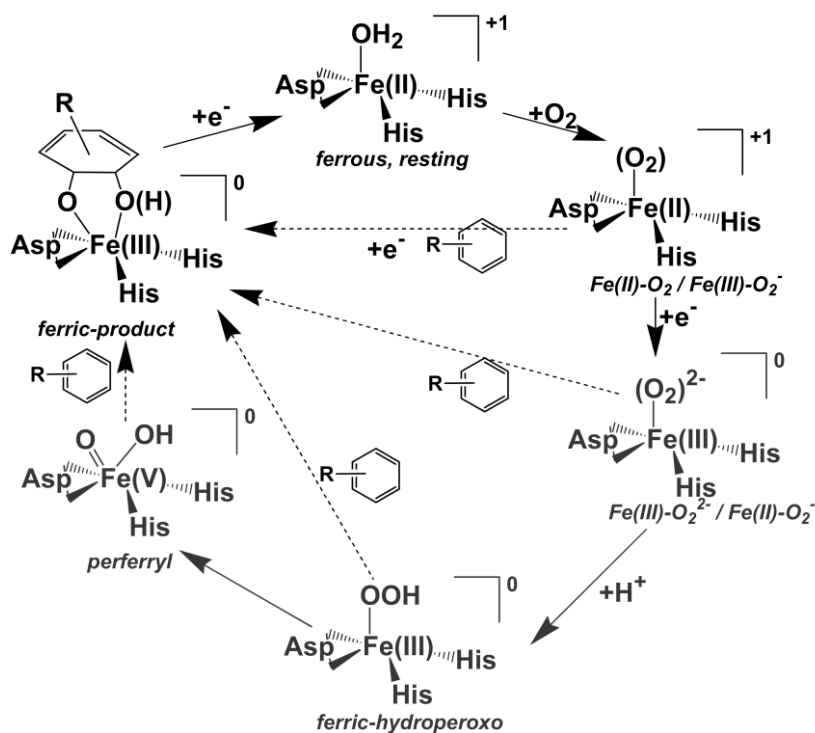


Figura 4-10. Ciclul catalitic propus pentru dioxigenazele de tip Rieske. Speciile prezentate în gri nu au fost încă detectate direct în experimente; liniile punctate arată posibile căi către produsul final al reacției, folosind diverșii agenți oxidanți care pot fi generați în acest situs activ.<sup>64</sup>

#### *Diol dioxigenaze*

Diol dioxigenazele, clasificate, așa cum se arată în Figura 4-11 în extradiol și respectiv intradiol dioxigenaze, folosesc un centru de fier non-heminic pentru a insera o moleculă de oxigen în substratul organic, fără însă a implica forme de fier de valență înaltă. Ciclurile catalitice, ilustrate în Figura 4-11, implică legarea oxigenului în punte între fier și un atom de carbon din substrat; în acest intermediar de reacție legătura oxigen-oxigen este extrem de slăbită și se rupe; prin comparație, în oxigenazele discutate până acum clivarea legăturii oxigen-oxigen era rezultatul

catalizei acido-bazice finalizate cu eliminarea unuia dintre cei doi atomi de oxigen sub formă de apă.

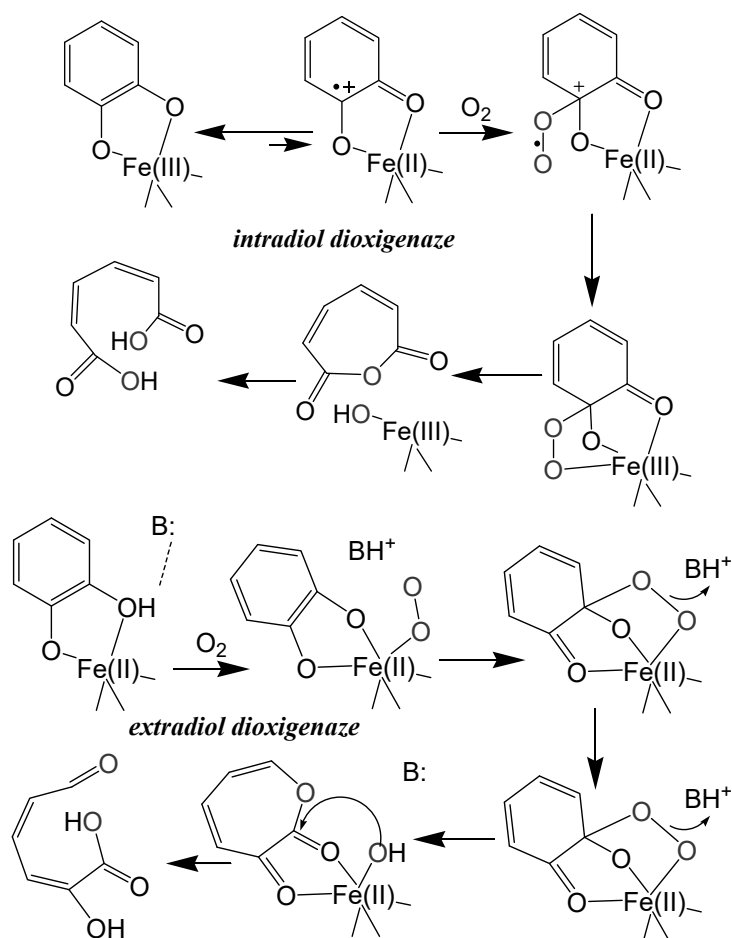


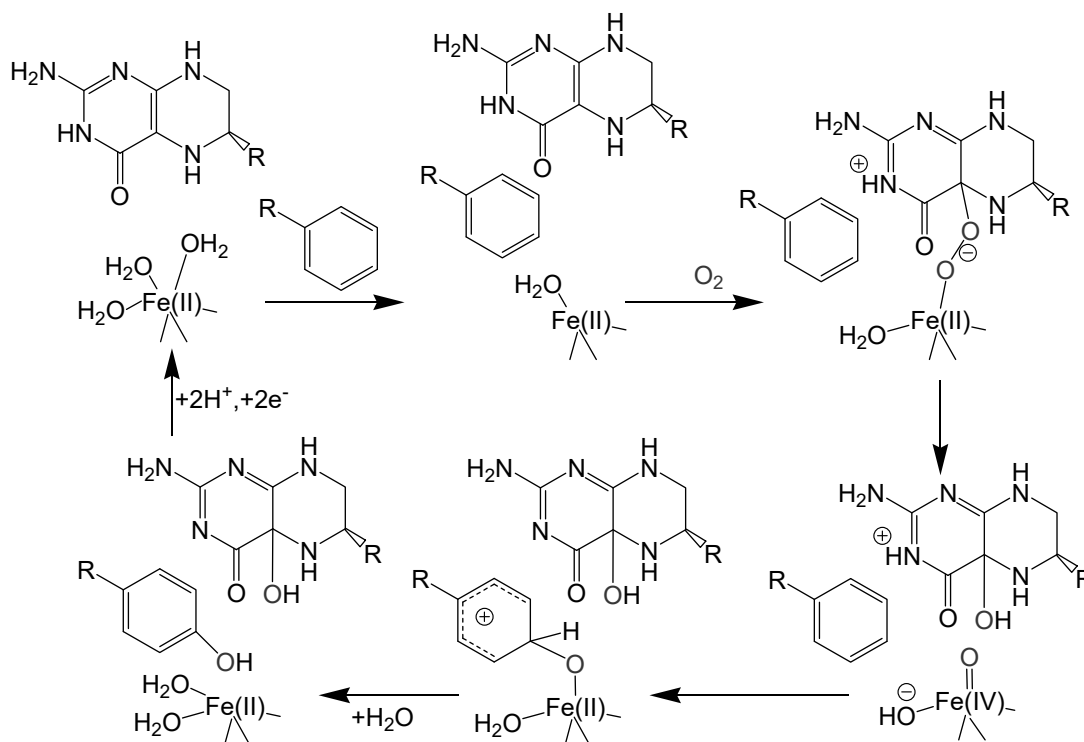
Figura 4-11. Reacțiile catalizate de diol dioxygenaze, și mecanismele acestora.

### ***Oxygenaze dependente de compuși organici***

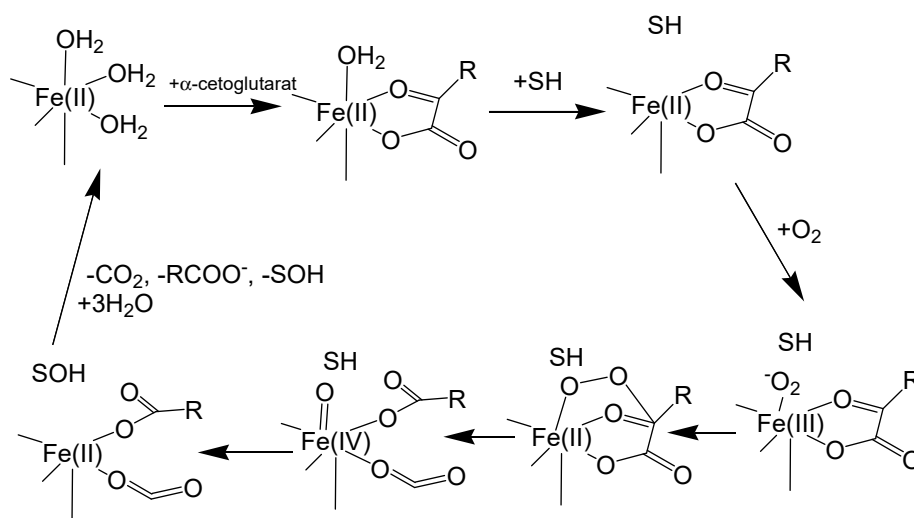
Urmând modelul diol dioxygenazelor, unde clivarea legăturii oxigen-oxigen era facilitată nu de protoni ci de un atom de carbon, există o serie de oxygenaze care folosesc o moleculă organică accesorie pentru a slăbi legătura oxigen-oxigen din ligandul O<sub>2</sub>.

Una dintre clasele din această categorie este cea a oxygenazelor pterin-dependente. Așa cum se arată în Figura 4-12, ele folosesc o pterină, regenerată la finalul ciclului catalitic, pentru a cliva legătura oxigen-oxigen homolitic, generând un centru Fe(IV) care apoi oxidează substratul enzimei.

O altă clasă de enzime ce folosesc această filozofie sunt cele dependente de  $\alpha$ -cetoglutarat ( $\alpha$ KG). În acest caz însă, așa cum se vede și în Figura 4-13,  $\alpha$ KG nu se poate regenera la finalul ciclului catalitic, constituindu-se astfel într-o moleculă de sacrificiu. Alături de  $\alpha$ KG, este necesar și un agent reducător accesoriu, pentru a aduce enzima la punctul de plecare, Fe(II). În cazul unora dintre enzimele implicate în sinteza țesutului conjunctiv și dependente de  $\alpha$ KG, acest agent reducător accesoriu este vitamina C, iar absența ei din organism afectează de aceea sever țesutul conjunctiv în boala numită scorbut, căreia i-au căzut victime nu numai numeroși exploratori ai mărilor ci și armate întregi în Evul Mediu – toate datorită nerecunoașterii importanței legumelor și fructelor proaspete în alimentație.



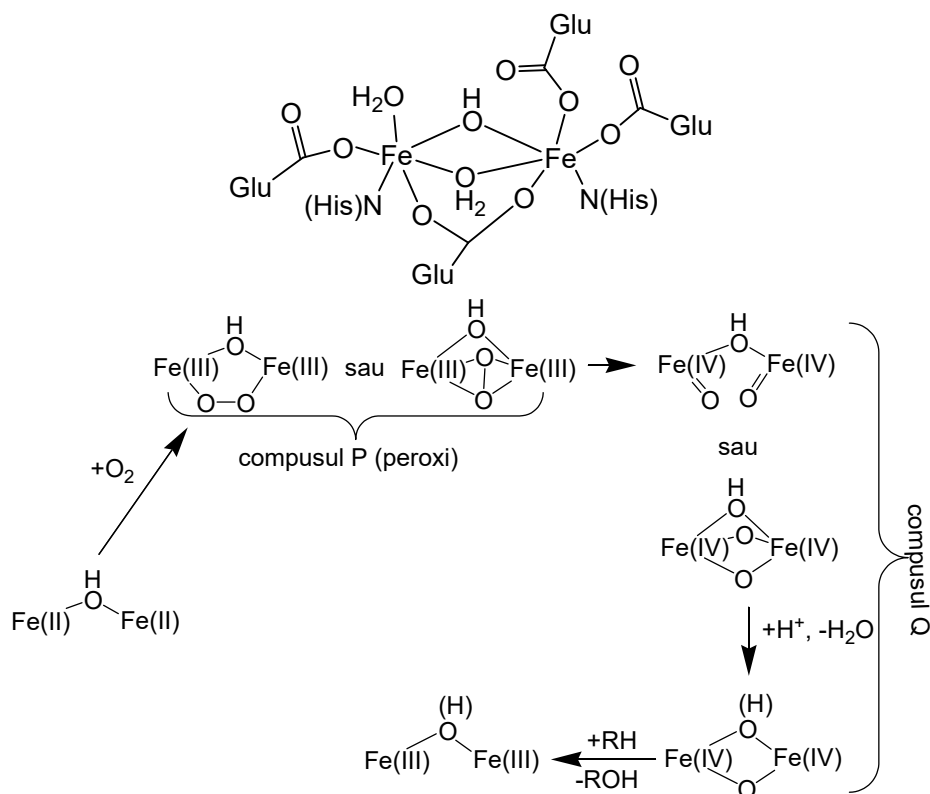
**Figura 4-12. Ciclul catalitic al oxigenazelor pterin-dependente.**



**Figura 4-13. Ciclul catalitic al oxigenazelor dependente de  $\alpha$ -cetoglutarat ( $\alpha$ -KG). „SH” reprezintă în mod generic substratul organic.**

### *Metan monooxigenaza cu fier*

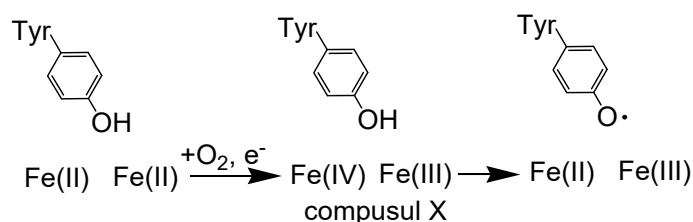
Oxidarea selectivă a metanului la metanol este dificil de realizat,  $\text{CH}_4$  prezentând una dintre cele mai puțin reactive legături carbon-hidrogen dintre compușii organici. Enzima capabilă de această reacție, metan monooxygenaza, prezintă un situs catalitic similar celui din hemeritrine sau rubreritrine, însă mult mai bogat în liganzi pe bază de oxigen (glutamat/aspartat). Structura și mecanismele propuse pentru acest centru activ sunt prezentate în Figura 4-14. Datorită prezenței a doi ioni de fier, starea maximă de oxidare la care se poate ajunge în acest situs în urma reacției cu oxigenul molecular și congenerii acestuia este  $\text{Fe(IV)}$ , și nu  $\text{Fe(V)}$  așa cum s-a văzut la dioxigenazele Rieske.



**Figura 4-14. Structura și mecanismele propuse pentru metan monooxigenaza cu fier.**  
În ce privește structura, notăm că în funcție de temperatură și de starea de oxidare liganzii pe baza de oxigen suferă rearanjamente (se pierd molecule de apă, carboxilații își pot schimba hapticitatea).

### Ribonucleotid reductaza

Ribonucleotid reductazele au ca funcție transformarea unității glucidice dintr-o nucleotidă într-o deoxiglucidă. Situsul activ pentru această reacție conține un radical tirozil; acest radical este generat prin reacția, la mare distanță în cadrul aceleiași proteine, dintre oxigenul molecular și un situs di-feros similar celui din metan monooxigenază; mecanismul propus pentru ribonucleotid reductază este prezentat în Figura 4-15.



**Figura 4-15. Mecanismul de reacție la situsul metalic din ribonucleotid reductaze.**

### 4.5.3. Oxigenaze cu cupru

Marea majoritate a tipurilor de reacții discutate până aici în acest capitol pot fi catalizate și de enzime pe bază de cupru. Figura 4-16 ilustrează câteva exemple în acest sens, iar Figura 4-17 ilustrează tipuri de situsuri active pe bază de cupru implicate în reacțiile din Figura 4-16. Până la un punct, oxigenazele cu fier și cele cu cupru funcționează după aceleași principii: metalul în starea redusă – Cu(I) de această dată – leagă oxigenul molecular, formând un aduct

Cu(I)-O<sub>2</sub> care prezintă electromerul Cu(II)-superoxo, și care poate fi redus la Cu(II)-peroxo și protonat la Cu(II)-hidroperoxo pentru a facilita ruperea legăturii oxigen-oxigen. Diferența majoră este că, spre deosebire de fier, în centrul pe bază de cupru regula generală este de a nu forma în continuare stări de valență înaltă (Cu(III)), ci de a folosi direct peroxidul coordonat la metal pentru a realiza reacția de oxidare.<sup>65</sup>

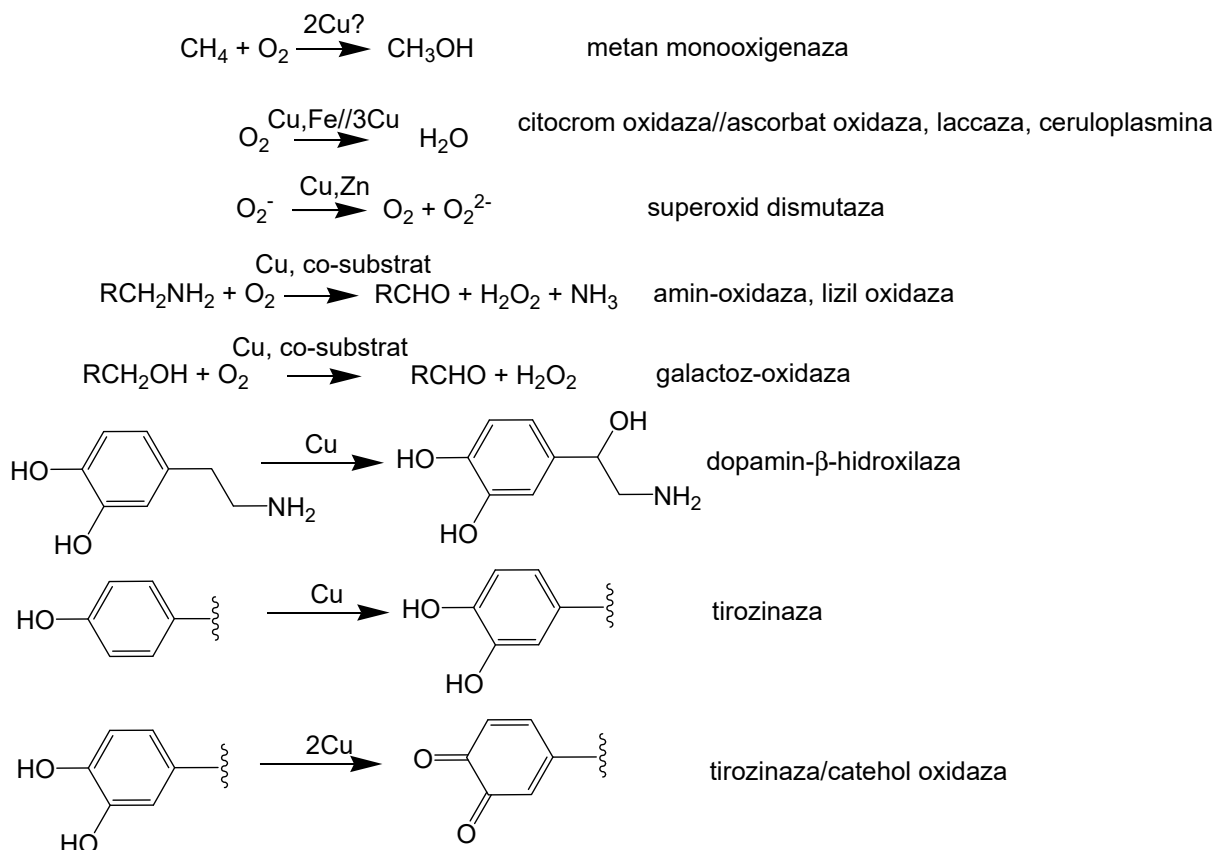


Figura 4-16. Procese catalizate de metaloproteine pe bază de cupru și implicând oxigenul molecular ori congenerii acestuia.<sup>66</sup>

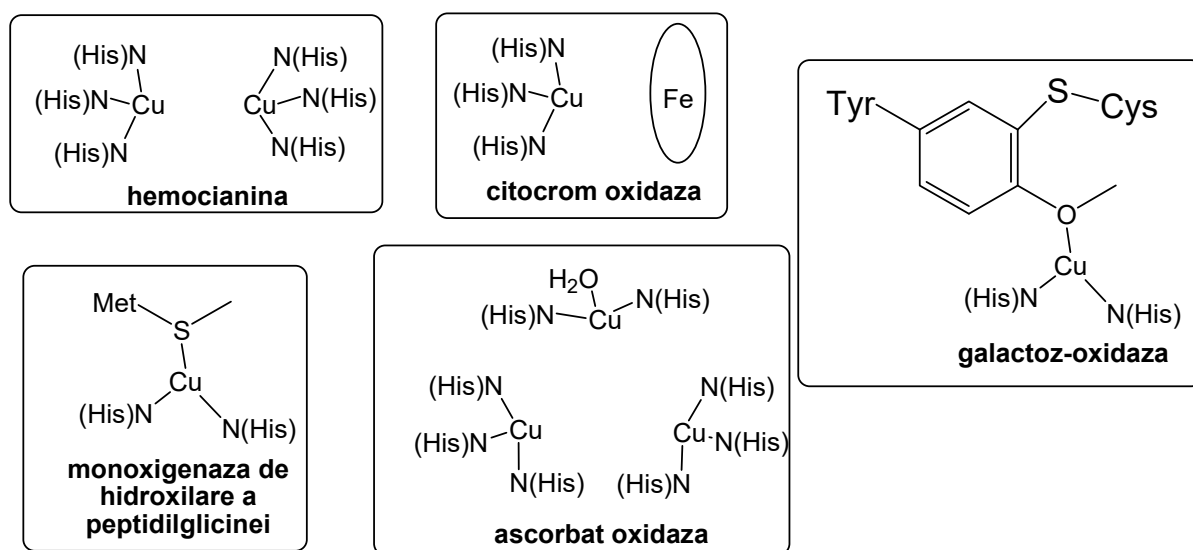


Figura 4-17. Situsuri active reprezentative pe bază de cupru.

#### **4.5.4. Oxigenaze cu mangan sau nichel**

Astfel de oxigenaze sunt mult mai puțin comune; ele funcționează se pare după principii foarte apropiate de cele după care funcționează oxigenazele cu fier non-heminic – sistemul de liganzi fiind similar și el între cele două clase de enzime.<sup>67</sup>

#### **4.5.5. Oxigenaze non-metalice**

Există și enzime, care nu formează tema de studiu pentru prezenta lucrare, în care oxigenul molecular este activat de centri pur organici; un exemplu de astfel de centru sunt flavinele – compuși aromatici activi redox, cu trei stări de oxidare accesibile (redușă, oxidată, și de radical liber).

## 5. Proteine transportoare de electroni și enzime înrudite cu acestea

O gamă largă de procese metabolice, dintre care unele au fost menționate în capitolele anterioare, necesită aportul sau eliminare de electroni către/dinspre situsul activ. Organismele vii au dezvoltat prin urmare proteine specializate în transportul electronilor. Se vor discuta aici patru clase principale de astfel de proteine, dintre care trei conține metale. Notăm că situsurile descrise aici pot să apară în proteine separate, dedicate exclusiv transportului de electroni, dar ele pot să apară și ca parte a unor angrenaje mai complexe în, spre exemplu, enzime – unde centrul de transfer de electroni servește la livrarea de electroni înspre sau dinspre situsul catalitic, iar uneori are și rol de modulare structurală a reactivității acestuia.

### 5.1. Proteine cu fier și sulf

Centrii activi din proteinele cu fier și sulf conțin predominant aceste două elemente. Exemple sunt ilustrate în Figura 5-1. În cel mai simplu reprezentant, rubredoxina, conține fierul coordinat tetraedric de patru liganzi cisteinat. Ferredoxinele conțin variante dimerice ale situsului din rubredoxine, în care se regăsesc în afara cisteinelor și două punți sulfido între cele două metale. Centrii de tip Rieske sunt înrudiți cu cei din ferredoxine, conținând două histidine în locul a două cisteine în sistemul de liganzi ai unuia dintre cei doi ioni de fier. Se pot construi apoi structuri mult mai complexe, după modelul ferredoxinei (liganzi cisteinat și punți sulfido), așa cum se vede în Figura 5-1. Este de notat faptul că deși multe din aceste structuri au accesibile în teorie multe stări de oxidare (exemplu, ferredoxina, ca centru binuclear – Fe(II)-Fe(II), Fe(II)-Fe(III), Fe(III)-Fe(III)), doar o parte restrânsă dintre aceste stări sunt accesibile și utilizate *in vivo*.<sup>68</sup>

Structurile de tipul celor din Figura 5-1 sunt general descrise în chimia anorganică drept clusteri – un domeniu foarte vast în sine.<sup>69</sup> În general fierul din structurile este de spin înalt, iar cu excepția evidentă a rubredoxinei el este cuplat (predominant) antiferomagnetic cu restul ionilor de fier din cluster – astfel încât în clusteri de doi, patru sau chiar mai mulți ioni de fier, unde fiecare Fe are 4 sau 5 electroni neîmperecheați (în funcție de starea de oxidare), numărul total aparent de electroni este zero sau 1 (în funcție de starea de oxidare netă), sau eventual, în cazuri mai rare, cu clusteri mai distorsionați, până la 3 sau 5.

Deși marea majoritate a centrilor cu fier și sulf au doar rol de transport de electroni, există și excepții. Dintre ele, cea mai notabilă este aconitaza, a cărei structură este ilustrată pe al doilea rând din Figura 5-1 și care catalizează izomerizarea citrat-izocitrat folosind ca intermediar aconitul, în cadrul ciclului acizilor tricarboxilici (a se vedea și Capitolul 6 pentru importanța acestuia din urmă).



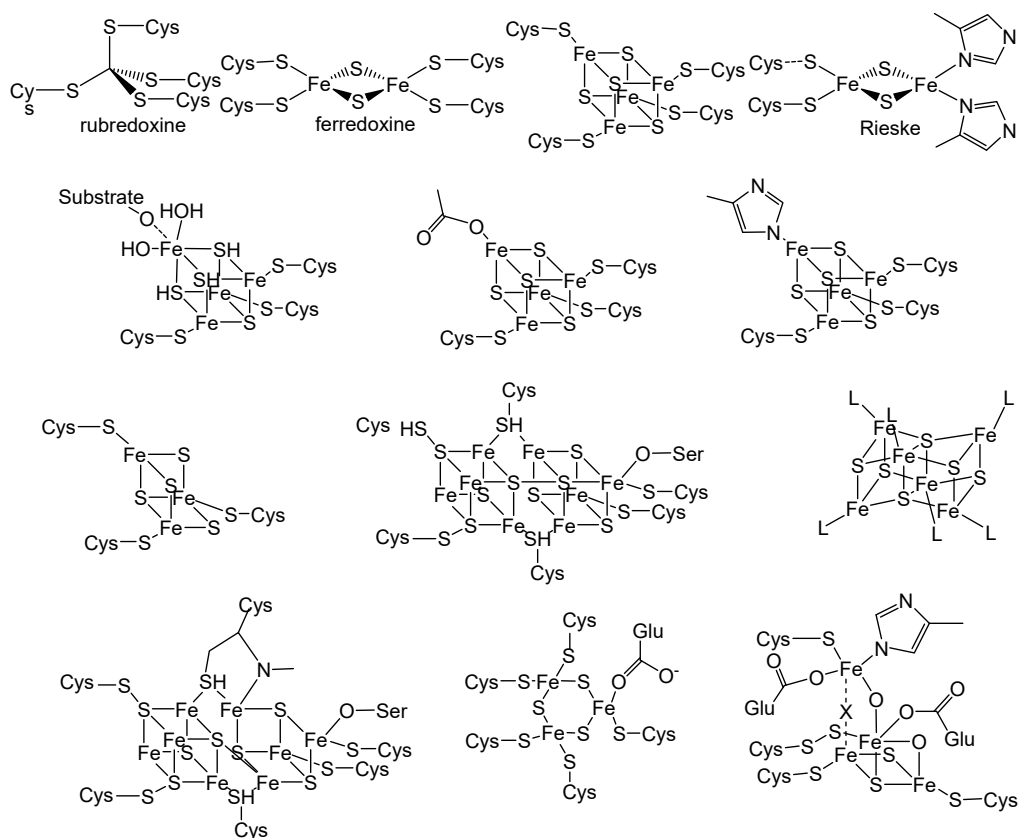


Figura 5-1. Centri cu fier și sulf din proteine.<sup>70</sup>

## 5.2. Citocromi

Denumirea de „citocrom” denotă în general hemoproteinele în biologie. Hemoproteinele cu rol de transport de electroni tind să fie hexacoordinate (cf. Figura 5-2), și sunt denumite după tipul de hem (*a*, *b*, *c*, etc, cf. Figura 5-3) și uneori și după anumite lungimi de undă la care se observă absorbanta caracteristică în spectrul UV-vis (exemplu – citocromul *c*<sub>552</sub>).

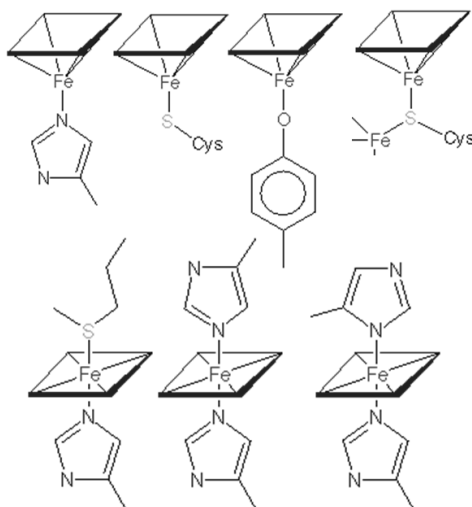


Figura 5-2. Moduri de coordonare ale hemului în hemoproteine. Proteinele transportoare de electroni urmează modurile de coordonare din rândul de jos, în timp ce structurile din rândul de sus sunt specifice enzimelor.<sup>70</sup>

Unii transportori de electroni, în virtutea implicării lor în căi metabolice esențiale, sunt ținte pentru mecanisme de reglare importante. Spre exemplu, citocromul *c* este implicat ca mesager în procesul de apoptoză – moartea programată a celulei.

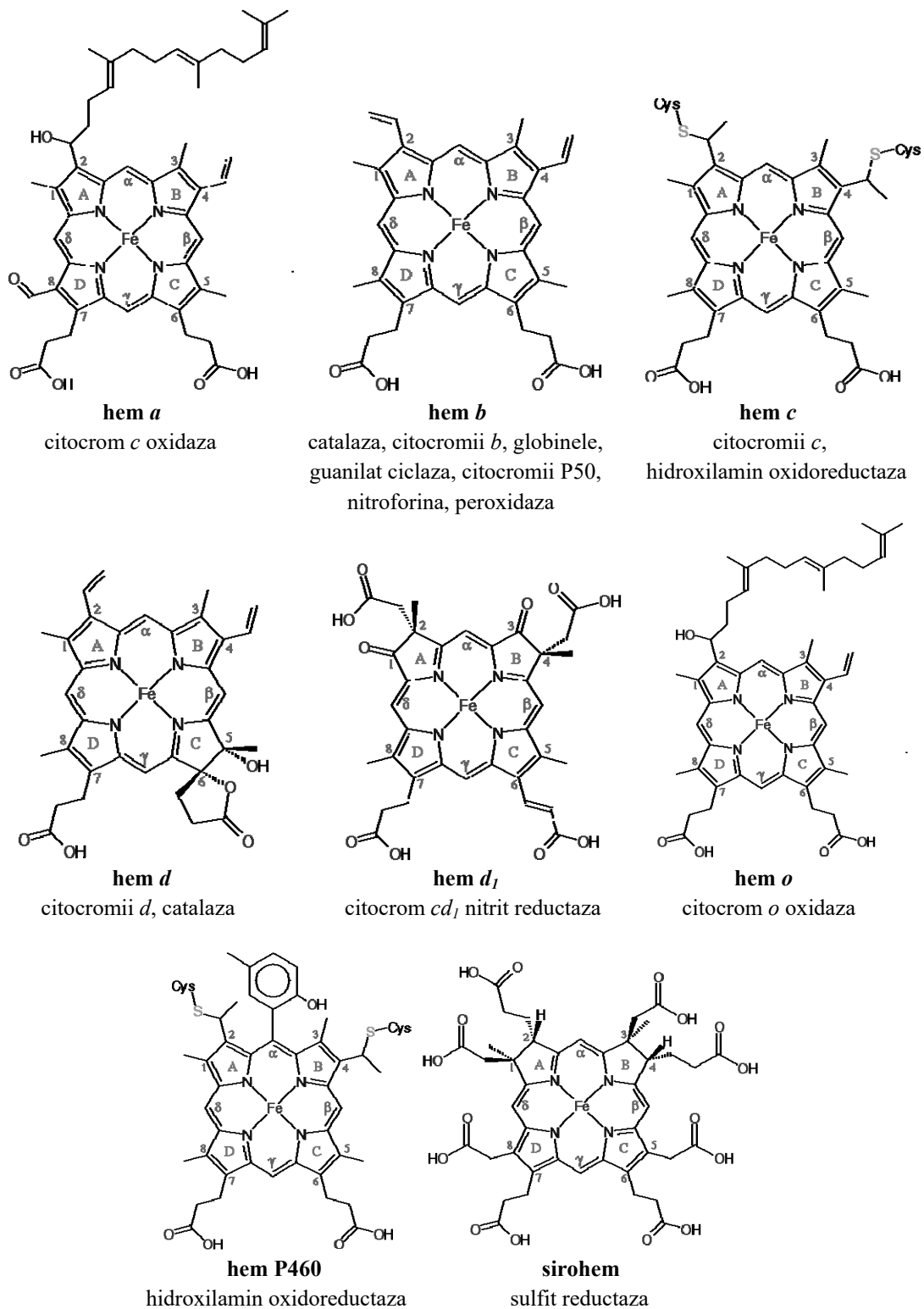
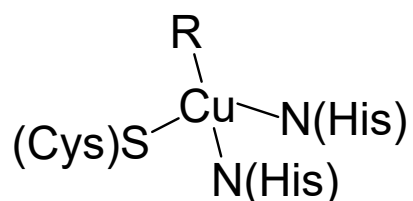


Figura 5-3. Tipuri de hem, și exemple de proteine în care acestea se găsesc.<sup>70</sup>

### 5.3. Proteine albastre cu cupru

Transportorii de electroni pe bază de cupru au un centru mononuclear, cu liganzii ilustrați în Figura 5-4. Prezența cisteinatlui face posibil un transfer de sarcină de la ligand la metal (LMCT) în spectrul UV-vis al formei Cu(II).<sup>71,72</sup> Întâmplarea face ca lungimea de undă a benzii LMCT să coincidă cu cea a tranzițiilor d->d ale ionului de cupru(II), astfel încât culoarea unui ion Cu(II) este albastră fie că se află liber în apă sau coordinat de proteina de transport de electroni. Diferența majoră este că tranzițiile LMCT ale cupru-proteinei au coeficient de extincție mult mai mare decât cele d->d ale cuprului liber, astfel încât culoarea proteinelor „albastre” cu cupru în forma oxidată este mult mai intensă decât a Cu(II) izolat. În concordanță cu această culoare relativ intensă, proteinele din această clasă conțin particula „cianină” în numele lor – ca de exemplu plastocianină, stelacianină sau amicianină.



**Figura 5-4. Centrul activ din proteinele de transport de electroni pe bază de cupru; „R” poate fi metionina (exemple – în azurină, plastocianină sau lacază), glutamat (în fitocianină) sau apa (în ceruloplasmină).**

### 5.4. Transportori de electroni non-metalici

Transportul electronilor poate fi realizat și de unități pur organice. Dintre acestea cele mai comune sunt flavinele (înglobate în proteine sub forma de FMN sau FAD) sau NAD(P)H ori chinonele (ca de exemplu ubiquinona).

## 6. Respirația

Principalul rol al oxigenului molecular în majoritatea organismelor cunoscute este de a contribui la așa-numitele „arderi celulare”, prin care nutrienții din alimentație (proteine, lipide, glucide) sunt transformați în  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ , energia degajată fiind înmagazinată în celulă sub formă de ATP (adenozin-trifosfat, molecula „monedă universală de energie” din organismele vii). Figura 6-1 prezintă o vedere de ansamblu a căilor de reacție care conduc de la nutrienți (glucide, lipide, proteine) la  $\text{CO}_2$  și apă, „coloana vertebrală” a acestora fiind glicoliza și mai ales ciclul acizilor tricarboxilici (TCA). O observație remarcabilă este că aceste căi din Figura 6-1 nu necesită oxigen molecular, atomii de oxigen din  $\text{CO}_2$  provenind din molecule de apă și nu din  $\text{O}_2$ . Acest proces de „ardere” constă astfel în oxidarea din punct de vedere redox a atomilor de carbon din glucide/proteine/lipide, electronii extrași fiind preluați pe transportorii specializați – NADH,  $\text{FADH}_2$ . Câțiva din pașii din acest lanț de reacții au și privilegiul de a produce direct energie sub formă de nucleozid-trifosfați (ATP, GTP). Totuși, majoritatea energiei aduse de nutrienți este, la finalul TCA, stocată sub forma electronilor plasați pe NADH și  $\text{FADH}_2$ . Rolul (esențial de altfel) al oxigenului molecular va fi de a facilita transformarea acestei energii într-una stocată sub formă de ATP.

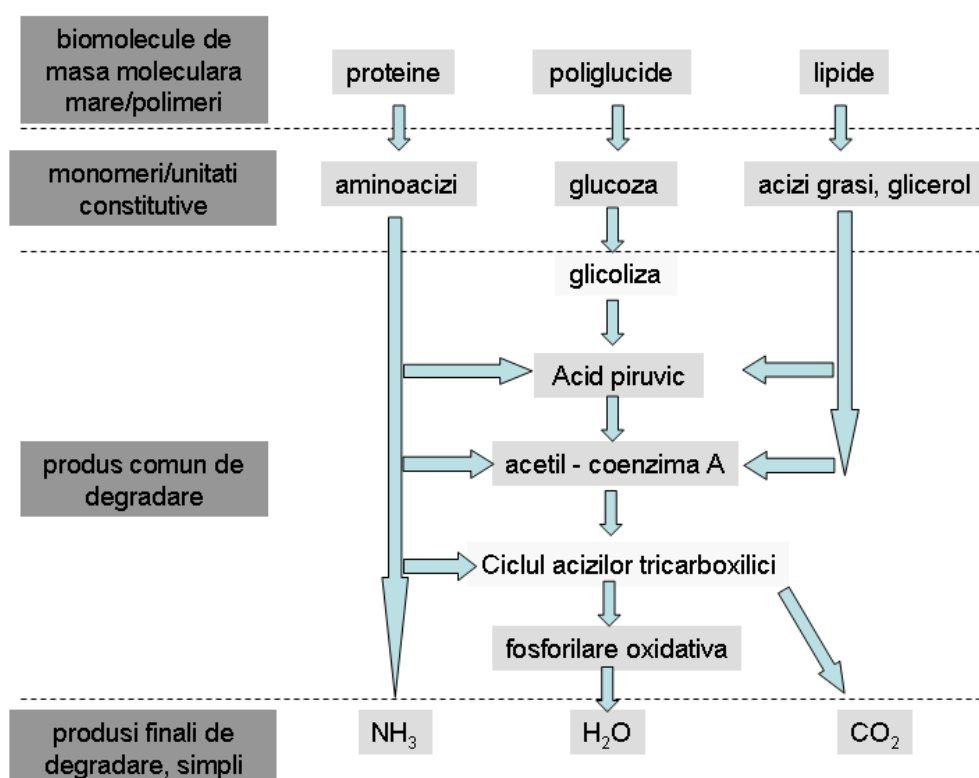
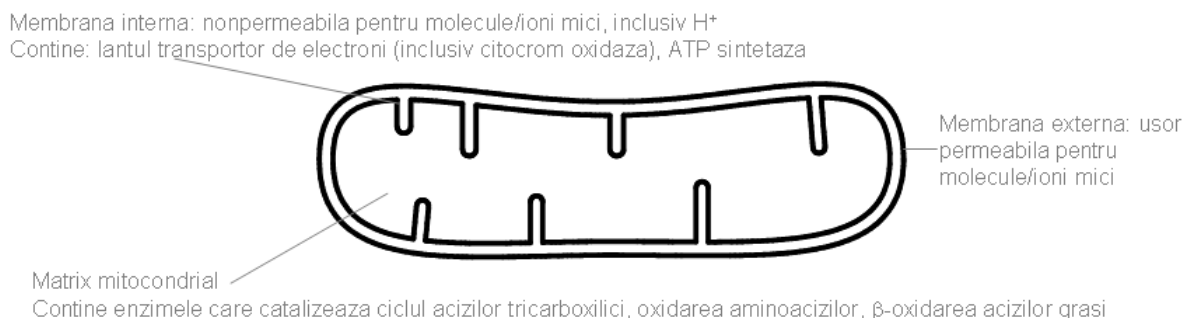


Figura 6-1. Căi metabolice.

TCA, în decursul căruia electronii sunt extrași din nutrienți, se desfășoară în organita celulară numită mitocondrie (cf. Figura 6-2). Aceasta prezintă două membrane (internă și

respectiv externă), ele delimitând la interior „matrixul mitocondrial” iar între cele două membrane „spațiul intermembranar”.

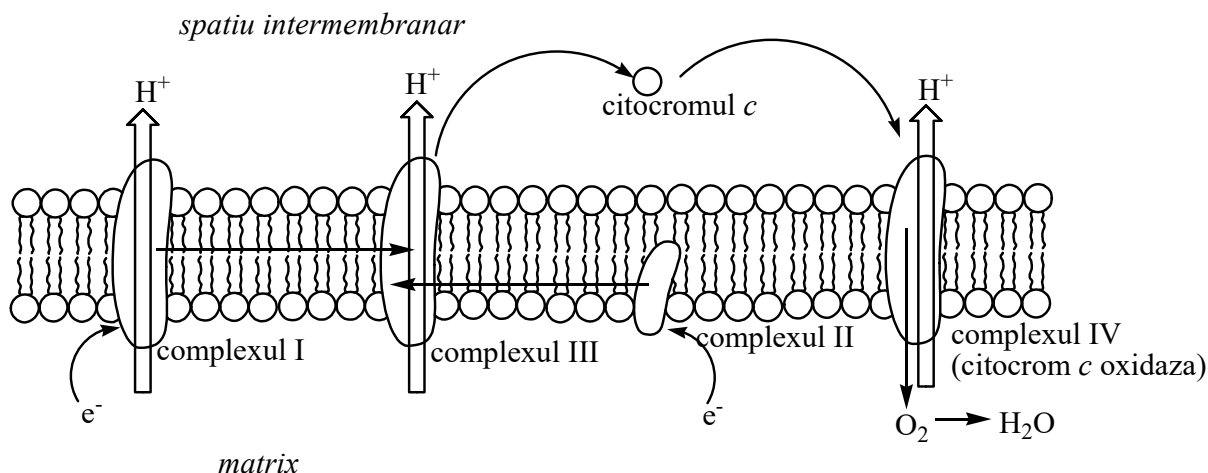


**Figura 6-2. Mitocondria.**

TCA se desfășoară în matrixul mitocondrial, electronii produși fiind transferați apoi către un lanț de proteine transportoare de electroni din membrana internă, numit, datorită importanței sale, chiar „lanțul transportor de electroni”. Așa cum se arată în Figura 6-3, acest lanț este format din patru complexe proteice – Complexul I, Complexul II, Complexul III și Complexul IV. În funcție de sursa exactă a electronilor din TCA, aceștia sunt preluați fie de Complexul I fie de Complexul II, de unde sunt transferați către Complexul III și apoi, prin intermediul citocromului *c*, către Complexul IV, numit și citocrom *c* oxidaza. Acest întreg traseu al electronilor prin membrana internă implică transferul lor în pași mici între diverși centri activi redox din categoriile celor discutați în Capitolul 5: centri cu fier și sulf, citocromi, centri cu cupru, chinone, flavine. Fiecare astfel de pas duce la disiparea unei părți din energia electronului, care este însă folosită de proteină, în mod intenționat, pentru deplasarea unor protoni din matrixul mitocondrial în spațiul intermembranar. Rezultatul net, la finalul traseului electronului prin Complecșii I, II, III și IV, este o acumulare de protoni în spațiul intermembranar, pe seama energiei aduse de electronii extrași din nutrienți. Electronii înșiși, odată ajunși la finalul traseului din Complexul IV, au deja o reactivitate mult redusă după ce energia lor a fost cheltuită pentru acumularea de protoni în spațiul intermembranar. Se pune prin urmare problema eliminării lor din sistem prin plasarea pe o moleculă „coș de gunoi”. Această moleculă trebuie să îndeplinească două condiții: să poată accepta electroni fără a genera produși toxici, și să se găsească în abundență. În cazul organismelor aerobe, inclusiv a oamenilor, această moleculă este oxigenul molecular, produsul său de reducere fiind apa. Există însă și organisme (în special bacterii) care folosesc alte molecule în locul oxigenului – ca de exemplu azotat, sulfat, sau chiar săruri anorganice insolubile („piatră”). Seria de procese descrise aici este denumită generic „respirație”; oxigenul molecular (sau celelalte molecule care îi iau locul în organismele non-aerobe) este denumit „acceptor final” de electroni, iar enzima în care are loc această ultimă reacție redox este denumită generic „oxidază terminală”. Dacă în oameni oxidaza terminală este citocrom *c* oxidaza, există în alte organisme și proteine înrudite, care folosesc alte tipuri de hem și un alt donor de electroni (chinone în locul citocromului *c*).<sup>11</sup>

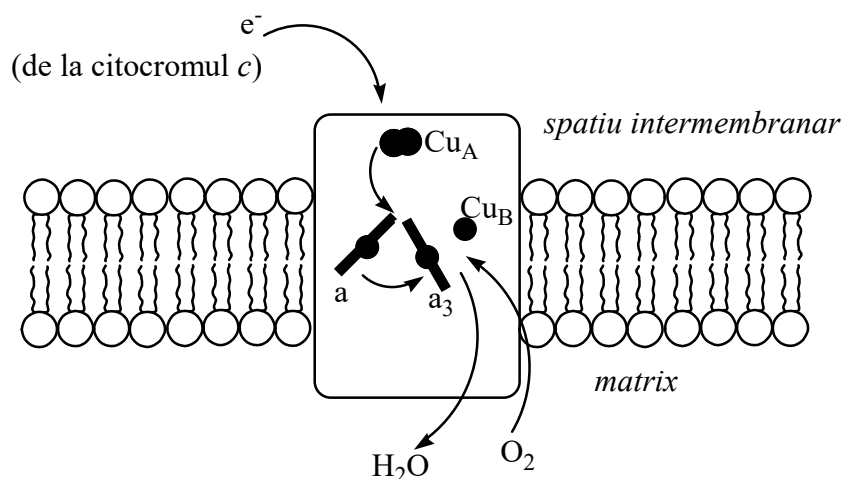
Pe de altă parte, energia stocată acum sub formă de gradient de protoni (exces în spațiul intermembranar în comparație cu matrixul mitocondrial) este apoi folosită de o ultimă enzimă din acest traseu, localizată tot în membrana internă, și care, pe seama acestei energii, sintetizează ATP pe măsură ce permite reîntoarcerea protonilor în matrix (funcționând în acest fel după

principiul hidrocentralei). În acest punct, energia extrasă din nutrienți a fost complet transformată într-o formă accesibilă oricărui alt compartiment al organismului.



**Figura 6-3. Lanțul transportor de electroni din membrana internă a mitocondrii.**  
Partea de jos a figurii ilustrează tipurile de centri redox din Complecșii I, II, III și IV, și raporturile în care se găsesc potențialele redox ale acestora.

Mecanismul de acțiune al citocrom oxidazelor este relativ complicat: ele trebuie să injecteze 4 electroni în molecula de oxigen aproape simultan. O reducere parțială a  $O_2$  cu doar unul, doi sau trei electroni ar însemna generarea de specii extrem de toxice: în aceeași ordine,  $O_2^-$ ,  $O_2^{2-}$ , sau  $OH\cdot$ . Prin urmare nu este surprinzător că citocrom c oxidaza conține nu mai puțin de patru centri metalici: unul binuclear de cupru (denumit  $Cu_A$ ), un hem de tip  $a$ , și un hem de tip  $a_3$  plasat în imediata vecinătate a unui centru de cupru ( $Cu_B$ ) – așa cum se arată în Figura 6-4. Cu roluri structurale se mai găsesc în această proteină și zinc și magneziu.



**Figura 6-4. Centrii metalici din citocrom c oxidază.**

Astfel, există posibilitatea de a stoca toți electronii necesari reducerii  $O_2$  la apă, încă înainte ca  $O_2$  să fie legat de proteină, astfel încât să se poată realiza reducerea eficientă direct la apă, evitând produșii toxici de reducere parțială menționați mai sus. Un mecanism propus în acest sens este ilustrat în Figura 6-5, cu observația că acesta nu este încă elucidat în

întregime – în primul rând din cauza vitezei extrem de mari a proceselor (unele operând pe scala micro și nano-secundelor).

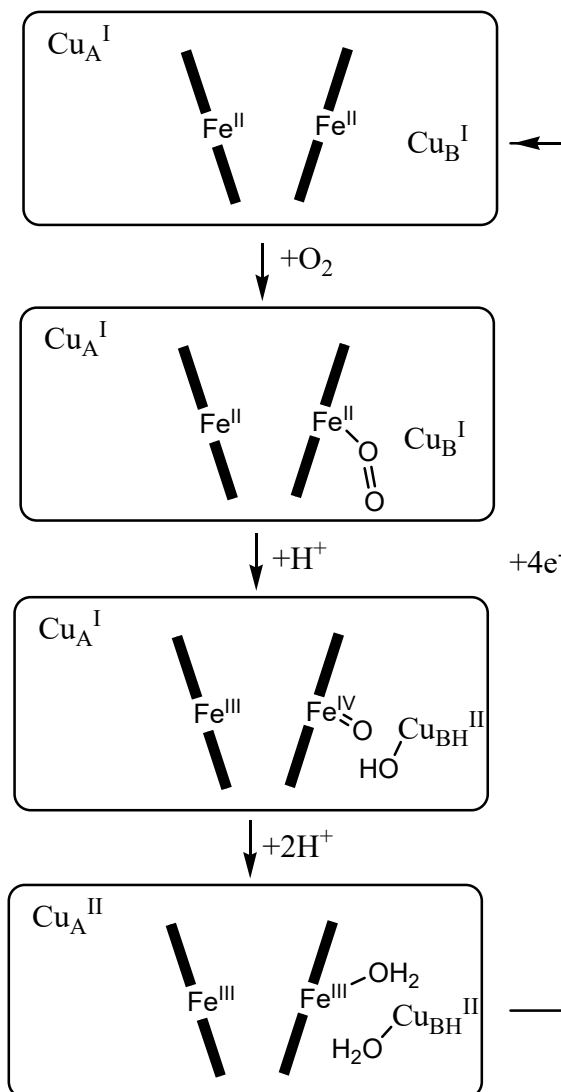


Figura 6-5. Mecanism propus pentru citocrom *c* oxidază.

## 7. Wolframul, molibdenul: oxigenare fără O<sub>2</sub>

În marea majoritate a cazurilor, molibdenul se găsește în componența proteinelor coordonat de unitatea ditiolenică a unei pterine, formând așa-numita molibdopterină, așa cum se arată în Figura 7-1. Restul sferei de coordinare este completat de liganzi oxo, hidroxo, sulfido, cisteinat, selenocisteinat sau chiar de o a doua unitate pterinică. Metalul oscilează în principal între două stări de oxidare – Mo(IV) și respectiv Mo(VI). Reacțiile catalizate sunt de natură redox și implică de obicei transferul unui atom de oxigen de la sau către substrat – în principiu, unul dintre liganzii oxo/hidroxo ai molibdenului, care, important de subliniat, deși sunt implicați în reacții de oxigenare, nu provin din oxigenul molecular (ca la oxigenazele din Capitolul 4) ci provin din apă. În această categorie de enzime intră nitrat reductaza, sulfid oxidaza sau arsenit reductaza. Chiar dacă molibdoenzime ca xantin oxidaza, sau diverse aldehyd oxidoreductaze (Figura 7-1), necesită și oxigen molecular pentru a funcționa, atomul de oxigen pe care acestea îl inserează în substrat provine tot dintr-o moleculă de apă, și nu din O<sub>2</sub>.<sup>73</sup>

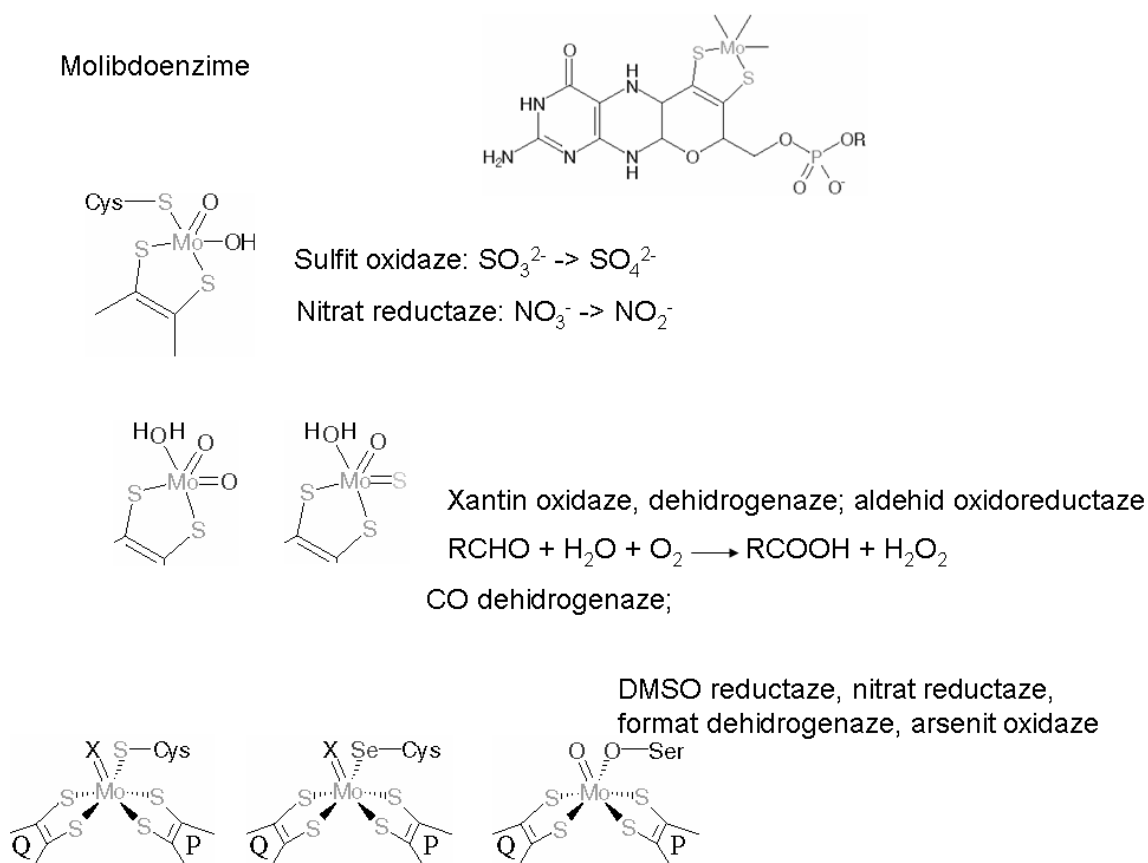


Figura 7-1. Moduri de coordonare a molibdenului în proteine.<sup>70</sup>

Wolframul se găsește în medii de coordonare foarte similare molibdenului. În fapt, cele două metale se pot înlocui unul pe altul în majoritatea proteinelor în care sunt prezente, fără a se pierde complet activitatea enzimatică respectivă. Totuși există enzime care acceptă exclusiv



wolframul în situsul activ. Acestea au două principale caracteristici. În primul rând, sunt coordonate de două unități pterinice. În al doilea rând, ele tind să fie prezente în organisme strict anaerobe, o parte din ele fiind și extremofile. Vom defini cu această ocazie în Tabelul 1 câteva clase de extremofile – organisme care cresc optim în condiții care din punct de vedere al ființei umane sunt definite ca extreme.

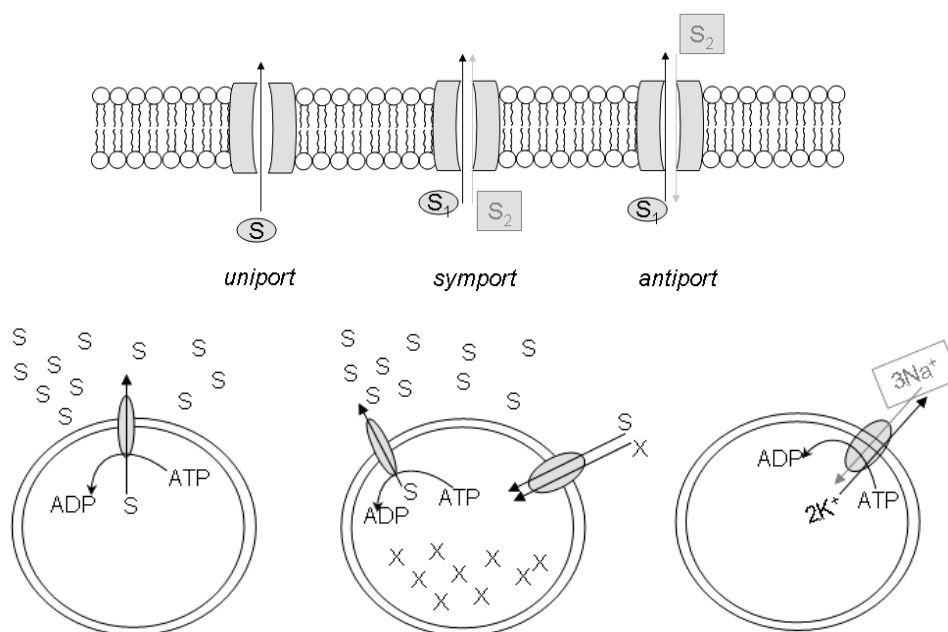
**Tabelul 7-1. Organisme extremofile.**

Denumire generică	Mediu preferat	Exemplu
acidofile	Acid (pH 2 sau mai mic)	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acidianus infernus</i>
alcalofile	Bazic (pH 9-11)	<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i>
halofile	Concentrații mari de săruri (peste 0,2 M)	<i>Halobacterium</i> , <i>Chromohalobacter beijerinckii</i>
hipertermofile	80-122°C	<i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Geothermobacterium ferrireducens</i>
metalotolerante	Concentrații mari de metale grele	<i>Ferroplasma</i> , <i>Cupriavidus metallidurans</i>
osmofile	Concentrații mari de glucide	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
piezofile/barofile	300-1000 atm	<i>Halomonas salaria</i>
Criofile/psihrofile	Sub 15°C	Anumiți membri ai familiilor <i>Halomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>
radiorezistente	radioactivitate	<i>Deinococcus radiodurans</i>
termofile	45-80°C (notăm că organismele care cresc optim sub aceste temperaturi poartă numele generic de mezofile)	<i>Thermus aquaticus</i>
xerofile	Mediu foarte uscat	<i>Trichosporonoides nigrescens</i>

## 8. Sodiul, potasiul, calciul, magneziul și elementele înrudite: echilibre osmotice, semnalizare, cataliză

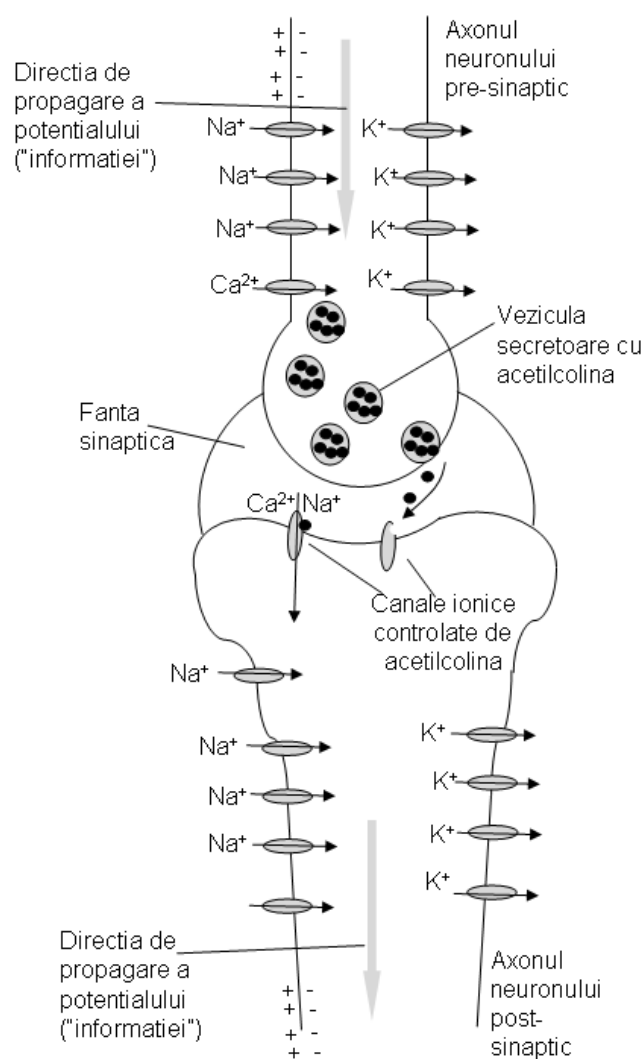
Discuția de până acum asupra sistemelor bioanorganice s-a centrat pe elemente prezente în urme în celulele vii. În cantități mult mai mari, din cauza solubilității lor mărite (respectiv a ușurinței cu care își schimbă liganzii) sunt metalele alcaline și alcalino-pământoase. Această proprietate a lor nu le recomandă în general drept componente importante ale situsurilor catalitice din enzime. Totuși, ele au alte roluri esențiale, ca asigurarea echilibrului de sarcină, transmiterea semnalelor, sau asigurarea presiunii osmotice. Astfel, multe biomolecule purtând sarcini electrice negative (acizii nucleici fiind cele mai comune exemple, datorită grupărilor fosfat din compoziția lor), au nevoie de contraioni pentru a compensa aceste sarcini; sodiul și potasiul sunt candidați excelenți în acest sens. Mai mult, concentrațiile sodiului, potasiului, calciului și ale altor ioni anorganici sunt menținute la nivele constante, presiunea osmotică în general fiind menținută constantă în interiorul unei celule.

Mecanismele prin care concentrațiile ionilor anorganici și presiunea osmotică sunt menținute constante implică transportul, de multe ori împotriva gradientului (deci cu consum de energie sub formă de ATP) acestor ioni prin membrana celulei, cu ajutorul unor proteine membranare specializate (denumite, de la caz la caz, canale, pompe, sau transportori). Figura 8-1 ilustrează câteva tipuri de astfel de proteine. Un caz aparte este cel al pompei de sodiu și potasiu din Figura 8-1: aceasta asigură o asimetrie între cele două fețe ale membranei celulare în ce privește sarcina electrică.



**Figura 8-1. Moduri de pompare/transport a ionilor prin membrane.**

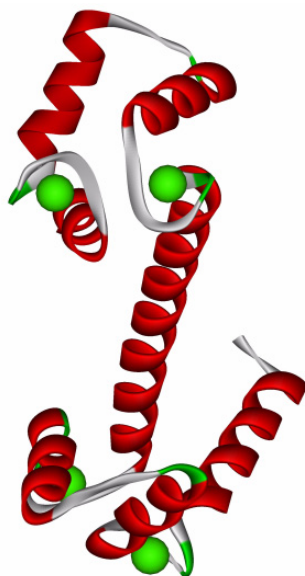
Figura 8-2 ilustrează modalitatea prin care sodiul, potasiul și calciul sunt implicate în transmiterea impulsurilor nervoase. Semnalul se manifestă la unul dintre capetele axonului din Figură (partea superioară a Figurii) prin deschiderea temporară a unei proteine-canal care permite intrarea în celulă a ionilor de sodiu. Afluxul local de sodiu la interiorul membranei este detectat de proteina canal din imediata vecinătate în aval pe axon, care ca răspuns se deschide și ea pentru scurt timp. În acest fel semnalul se propagă până la capătul opus al axonului, către joncțiunea cu axonul următor (sinapsa). În apropierea sinapsei se deschid în plus și proteine-canal pentru calciu, care în continuare declanșează eliberarea unor vezicule conținând acetilcolină în spațiul dintre cele două celule nervoase. Acetilcolina ajunge la celula vecină, unde inițiază transmiterea impulsului nervos prin aceasta, legându-se la o proteină-canal pentru sodiu, pe care o deschide; în continuare, în acest al doilea axon semnalul se propagă după modelul descris mai sus pentru primul axon.



**Figura 8-2. Modul de transmitere a semnalelor prin celulele nervoase.**

Pe lângă celulele nervoase, calciul joacă roluri de semnalizare în multe alte locuri. Adesea, receptorul care detectează prezența calciului prezintă un motiv structural prezentat în Figura 8-2 pentru proteina numită calmodulina, și anume „mâna EF” – un situs de legare a calciului la joncțiunea dintre două porțiuni de helix  $\alpha$  care în calmodulină se întâmplă să fie denumite

helixurile E și F și care, așa cum se ilustrează în Figura 8-3, ar prezenta o oarecare asemănare cu o mână.



**Figura 8-3. „Mâna EF”,  
un model structural de legare  
a calciului în proteine.**

Deși, după cum s-a arătat mai sus, metalele alcaline și alcalino-pământoase tind să nu fie implicate în situsurile catalitice, există și excepții notabile. Una dintre ele este enzima Rubisco (ribulozo 1,5-bisfosfat carboxilaza/oxigenaza), care are la situsul activ un ion de magneziu. Această enzimă se găsește în plante și este singura responsabilă pentru transformarea carbonului anorganic,  $\text{CO}_2$ , în materie organică, după mecanismul ilustrat în Figura 8-4. Rolul metalului este doar de a fixa glucida de care se va atașa dioxidul de carbon. Particula „oxigenază” din numele enzimei face referire la faptul că ocazional enzima acceptă  $\text{O}_2$  în loc de  $\text{CO}_2$  ca substrat, catalizând o reacție de oxigenare în locul celei de carboxilare dorite. Alte exemple de situsuri catalitice atipice sunt cel pe bază de calciu din unele lipaze, sau cel pe bază de potasiu din unele fosfataze.

O altă situație notabilă unde metalele alcaline și alcalino-pământoase sunt implicate în cataliză este cea în care ele servesc drept contraioni sau eventual chiar fixează activ un reactant. Exemple includ legarea la nucleotide (complexul Mg-ATP spre exemplu) și acizi nucleici (orice enzimă sau ribozimă care le editează va avea nevoie de contraioni la situsul catalitic pentru grupările fosfat).

Proprietățile acido-bazice și caracteristicile de coordonare ale calciului în enzime pot fi mimate și de elemente înrudite. Un caz aparte este cel al unor lantanide (vezi și Tabelul 2-5), care nu doar că pot înlocui calciul în unele enzime din organisme bacteriene, ci par să aibă chiar mecanisme proprii de recrutare/traficare (spre exemplu un analog al calmodulinei, numit lanmodulină) și câteva enzime care folosesc anume lantanide la situsul catalitic; în aceste din urmă cazuri, cataliza este efectuată de către un cofactor organic. Proprietățile chimice foarte similare între ele ale acestor lantanide fac să nu fie clar dacă există vreun mecanism sau proteină care preferă clar unul singur dintre acestea – deși argumente au fost prezentate spre exemplu în privința americiului.<sup>74,75</sup>

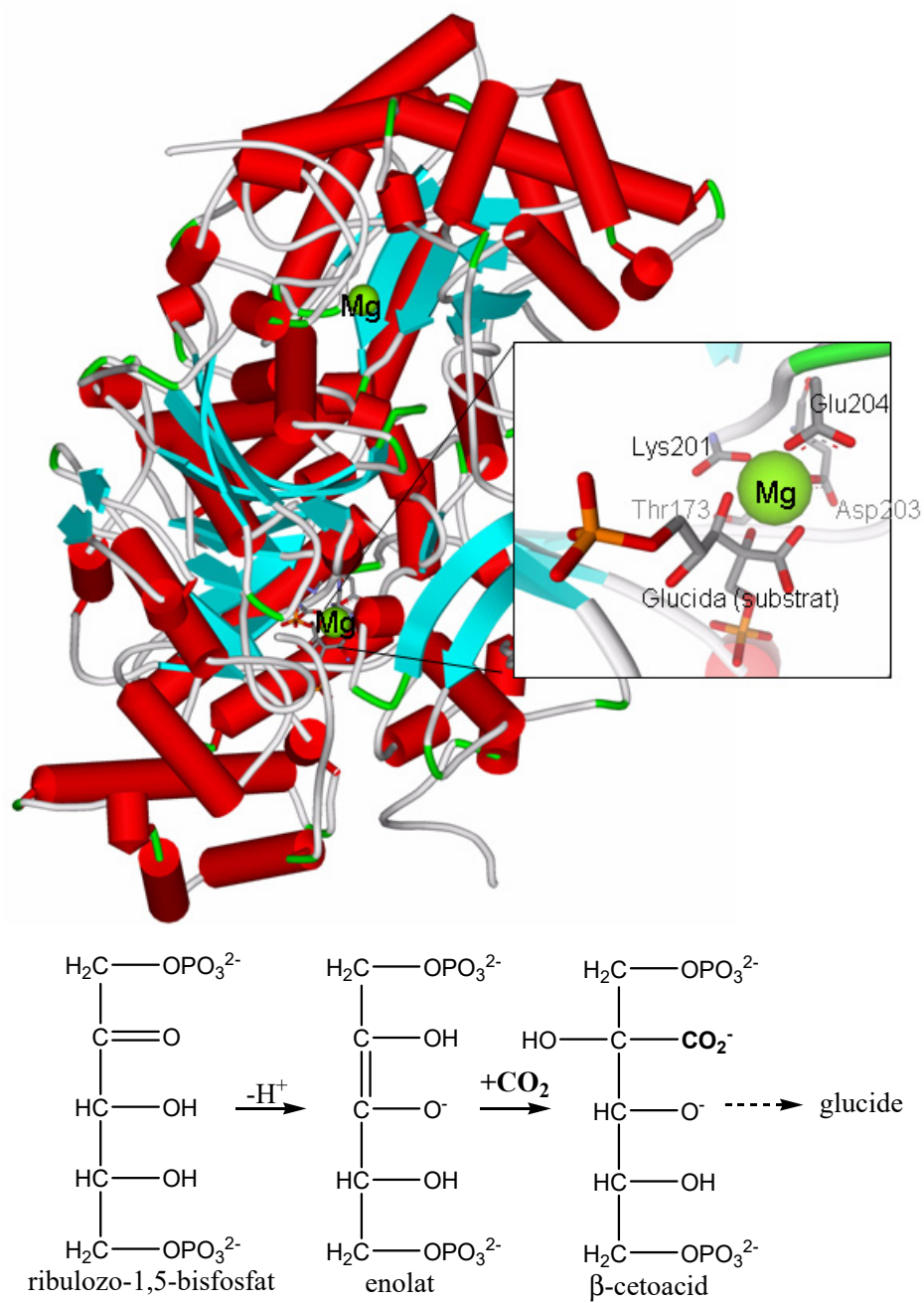


Figura 8-4. Situsul activ și reacția catalizată de Rubisco.

## 9. Proteine implicate în ciclul azotului; alte cicluri similare

Figura 9-1 prezintă ciclul azotului în natură; mare parte din aceste procese sunt caracteristice bacteriilor. Toate enzimele ce catalizează aceste reacții sunt metaloproteine. Scopurile pentru care sunt efectuate aceste reacții sunt diverse. Spre exemplu, unele organisme produc amoniac cu scopul de a-l folosi în compuși organici; altele folosesc oxianionii azotului pentru respirație; pentru altele, oxizii și oxianionii azotului (în special NO și azotitul, dar și specii ca  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , derivate prin reacții secundare din speciile prezentate în Figura 9-1) constituie o formă de stres (denumit, prin analogie cu stresul oxidativ, „stres nitrozativ”).

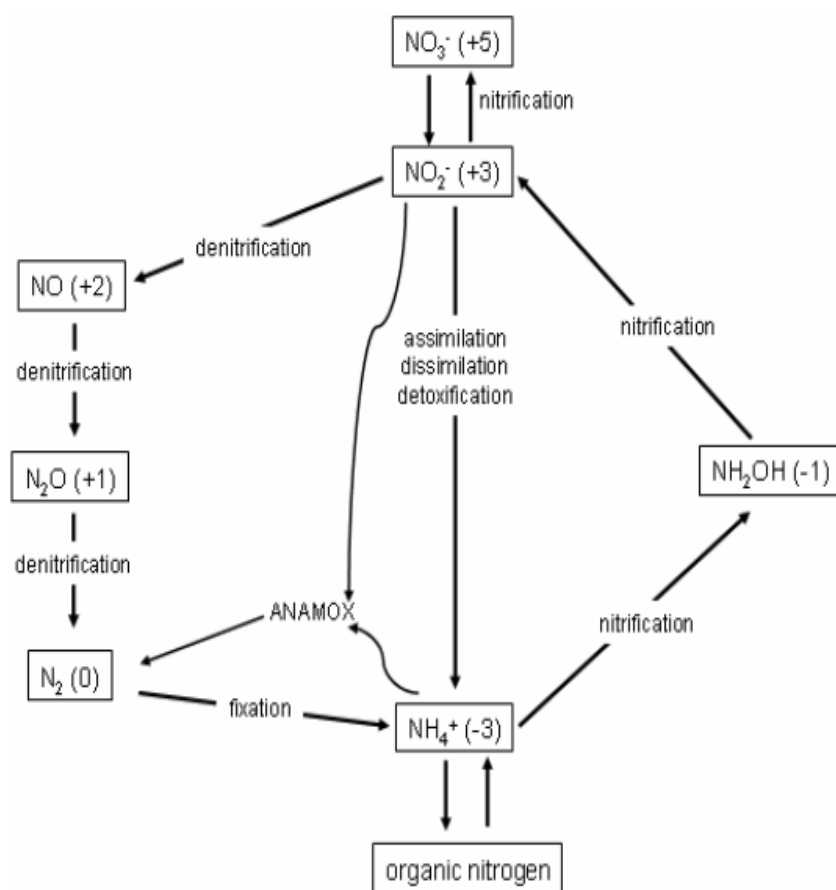
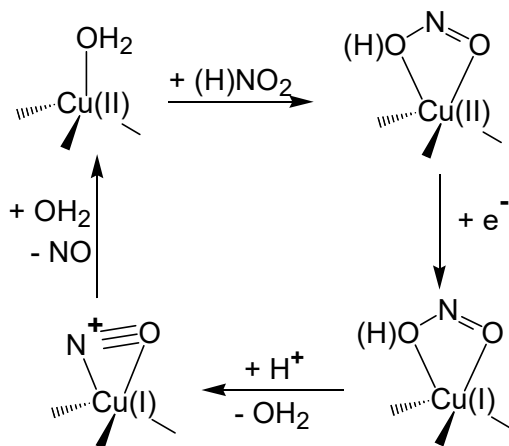


Figura 9-1. Ciclul azotului în organismele vii.  
În paranteze sunt date stările formale de oxidare ale azotului în fiecare dintre compuși.<sup>30</sup>

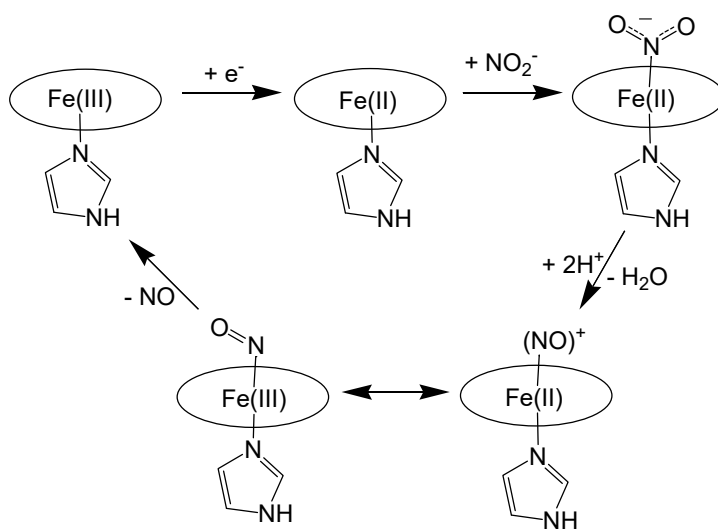
Nitrat reductazele sunt enzime pe bază de molibden, prezente în plante și bacterii, și au fost discutate în Capitolul 7; produsul lor de reacție este azotitul. Acesta din urmă este redus mai departe de către nitrit reductaze.

Nitrit reductazele se împart în două clase după produsul de reacție – amoniac sau monoxid de azot. Unele reduc azotitul cu scop metabolic, altele cu scop protectiv.

Nitrit reductazele pe bază de cupru operează după mecanismul ilustrat în Figura 9-2, producând monoxid de azot. Același produs este furnizat și de citocrom  $cd_1$  nitrit reductaze, care au la situsul activ un hem de tip  $d_1$  și operează după mecanismul ilustrat în Figura 9-3. Pe de altă parte, citocrom  $c$  nitrit reductaza deși cu un centru catalitic foarte similar citocrom  $cd_1$  nitrit reductazei, are ca produs amoniacul.



**Figura 9-2. Ciclul catalitic al nitrit reductazelor pe bază de cupru.**  
Metalul este coordonat de către proteină prin intermediul a trei histidine.<sup>76</sup>



**Figura 9-3. Ciclul catalitic al citocrom  $cd_1$  nitrit reductazei.**  
Hemul este reprezentat simbolic sub forma unui oval.<sup>77</sup>

NO reductazele reduc monoxidul de azot la  $N_2O$ . Situsurile lor catalitice se clasifică în două categorii principale. Citocrom P450 NO-reductaza (P450NOR, Figura 9-4) are un situs catalitic similar citocromilor P450 – un hem feric coordonat axial de cisteinat. Spre deosebire însă de monooxigenazele de tip P450, în P450NOR situsul activ este foarte accesibil din exterior, astfel încât după legarea NO la Fe(III) are loc legarea unei molecule de NAD(P)H, care transferă un ion hidrură către monoxidul de azot coordinat la fier, rezultând un aduct Fe-N(H)-O. Acesta din urmă reacționează cu o a doua moleculă de NO, rezultând probabil ca intermediar acidul hiponitros, HO-N-N-OH, care este extrem de instabil și se descompune la  $N_2O$  și  $H_2O$ .<sup>12</sup>

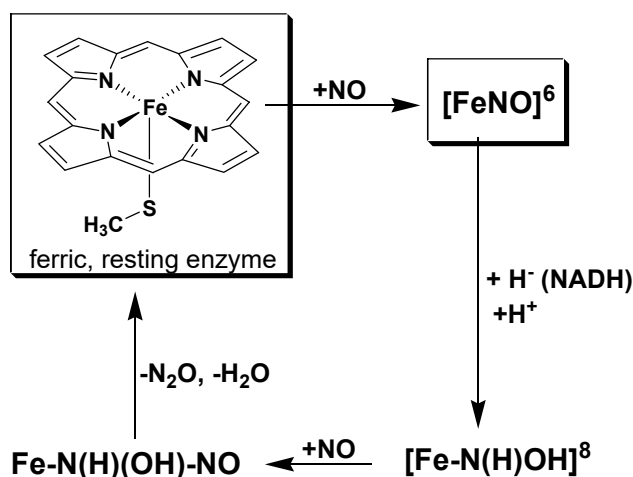


Figura 9-4. Ciclul catalitic al P450NOR. Speciile încadrate în chenare sunt stabile, iar restul – intermediari de reacție cu viață foarte scurtă.<sup>78</sup>

O a doua clasă de NO-reductaze conțin un situs activ binuclear, format din fier hemic și non-hemic. Mecanismul propus de acțiune pentru aceste enzime este ilustrat în Figura 9-5. Ceva mai recent descoperită este o clasă de enzime care funcționează atât ca NO reductaze cât și ca oxidaze (reducând oxigenul molecular la apă), și al căror situs activ conține un centrul bimetalic de fier non-hemic asemănător celui din metan monooxigenaze.

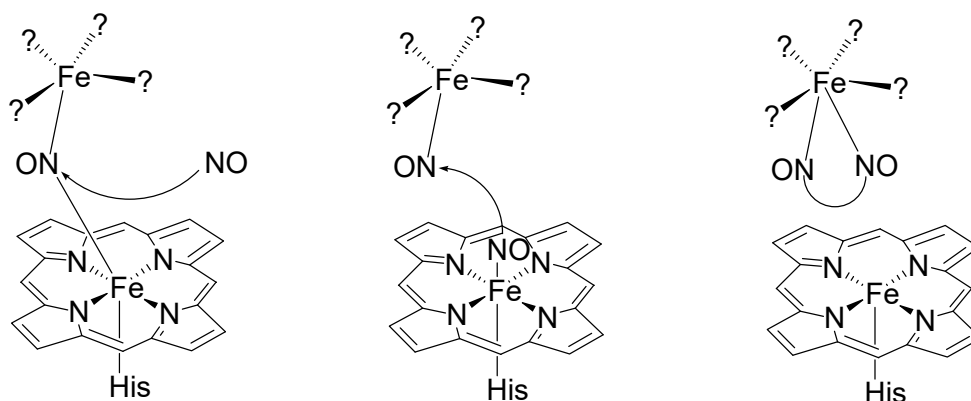


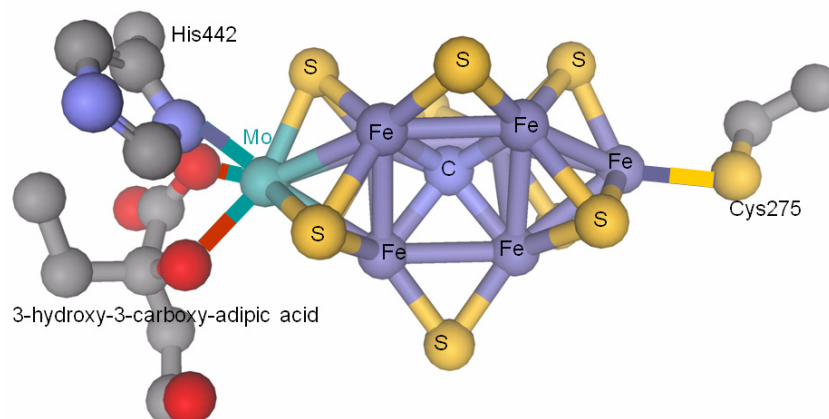
Figura 9-5. Situsul catalitic al NO-reductazelor cu situs binuclear mixt, hemic + non-hemic, ilustrând și posibili intermediari de reacție din ciclul catalitic.

N<sub>2</sub>O este o moleculă foarte inertă chimic, care nu funcționează de obicei la ligand la metale. De aceea nu este surprinzător că N<sub>2</sub>O reductaza, care reduce acest gaz la N<sub>2</sub>, prezintă un situs activ aparte, multinuclear de cupru, denumit Cu<sub>2</sub> în Figura 4-17.

Enzima care reduce N<sub>2</sub> la amoniac, nitrogenaza, este una dintre cele mai cunoscute metaloproteine, atât datorită reacției remarcabile pe care o catalizează, cât și datorită importanței sale în ecosisteme, ea fixând azotul anorganic din aer și permițând transformarea lui în materie organică. Situsul activ al acestei enzime este pe măsura reacției, extrem de complex în comparație cu toate celelalte metaloenzime, după cum se ilustrează în Figura 9-6. Mecanismul de acțiune e nu este încă clar.

Enzima care acționează asupra hidroxilaminei (hidroxilamin oxidoreductaza) este o hemoproteină, asemeni unora dintre nitrit reductaze.



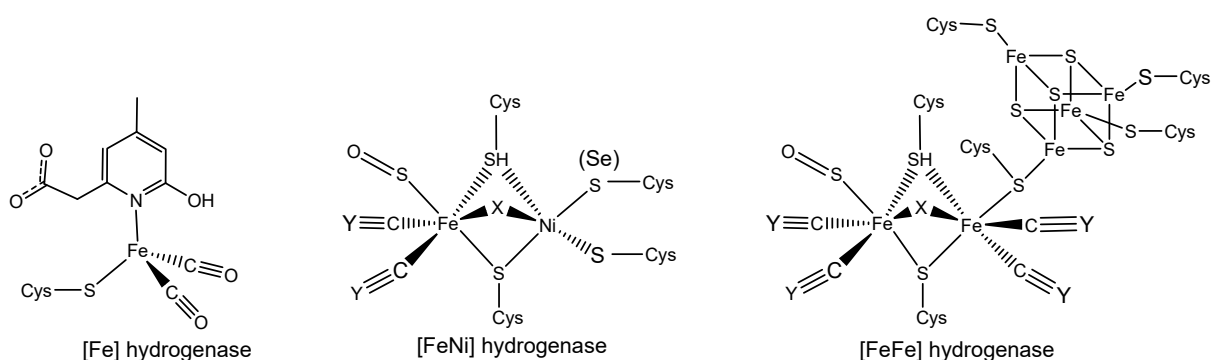


**Figura 9-6. Situsul activ al nitrogenazelor cu molibden.**  
Este important de notat că există și variante de nitrogenaze care folosesc vanadiu sau fier în loc de molibden.

Cicluri similare cu ale azotului se pot defini și pentru alte oligoelemente – dintre care sulful este cel mai amplu studiat<sup>79–85</sup> – însă se pot menționa și altele, precum arsenul.<sup>86</sup>

## 10. Hidrogenaze, metanogeneza

Hidrogenazele catalizează reducerea reversibilă a protonilor la hidrogen molecular. Ele conțin trei tipuri de centri activi, dintre care două tipuri sunt ilustrate în Figura 10-1: cu Fe și Ni, și respectiv doar cu Fe. Structura situsului activ a celei de-a treia clase este încă ne-elucidată. Comune celor două clase de hidrogenaze ale căror structuri sunt cunoscute sunt prezența liganzilor pe bază de sulf, și mai ales a unor liganzi complet atipici, de tip CO sau CN<sup>-</sup> (după cum ilustrează Figura 10-1). Aceste trăsături structurale au în comun proprietatea de a îmbogăți în electroni cei doi ioni metalici, în contextul în care aceștia trebuie să fie capabili de a coordina liganzi extrem de atipici: H<sup>+</sup> H<sub>2</sub>. Mecanismele acceptate pentru aceste enzime în fapt implică stări de valență neobișnuite pentru aceste metale – Ni(I), Fe(I).



**Figura 10-1. Situsuri active ale hidrogenazelor.**  
Y poate fi azot, oxigen sau sulf; X este cel mai probabil sulf.

Din punct de vedere al locației celulare, hidrogenazele se pot găsi în citoplasmă sau atașate de membrană. Acestea din urmă au capacitatea de a se implica în generarea de gradienti de protoni, cu rol așadar în transformarea energiei (similar fenomenelor discutate în Capitolul 6).

Unele organisme au capacitatea de a produce metan (metanogene). Ultima etapă din lanțul de reacții care duce la metan pune o problemă interesantă de chimie bioanorganică. Este implicat aici un centru metalic denumit coenzimă F<sub>430</sub>, cu structura ilustrată în Figura 10-2.

În cadrul mecanismului, la ionul de nichel al F<sub>430</sub> este adusă o grupare metil, de către un transportor specializat – coenzimă M. Două mecanisme de reacție sunt propuse în continuare, ambele implicând forma Ni(I) a metalului. Unul se bazează pe formarea unei legături Ni-C între gruparea metil și F<sub>430</sub>, urmată de ruperea legăturii sulf-metil și protonarea ulterioară a grupării metil; celălalt mecanism propune formarea unei legături Ni-S între F<sub>430</sub> și metil-coenzimă M, ceea ce ar duce la slăbirea legăturii sulf-metil și facilitarea transferului unui proton către gruparea metil. În ambele mecanisme, un rol important îl joacă și coenzimă B (Figura 10-2), care furnizează protonul necesar grupării metil pentru a se transforma în metan, și în același timp preia coenzimă M, formând o legătură -S-S- cu aceasta după (sau concomitent cu) eliberarea metanului.

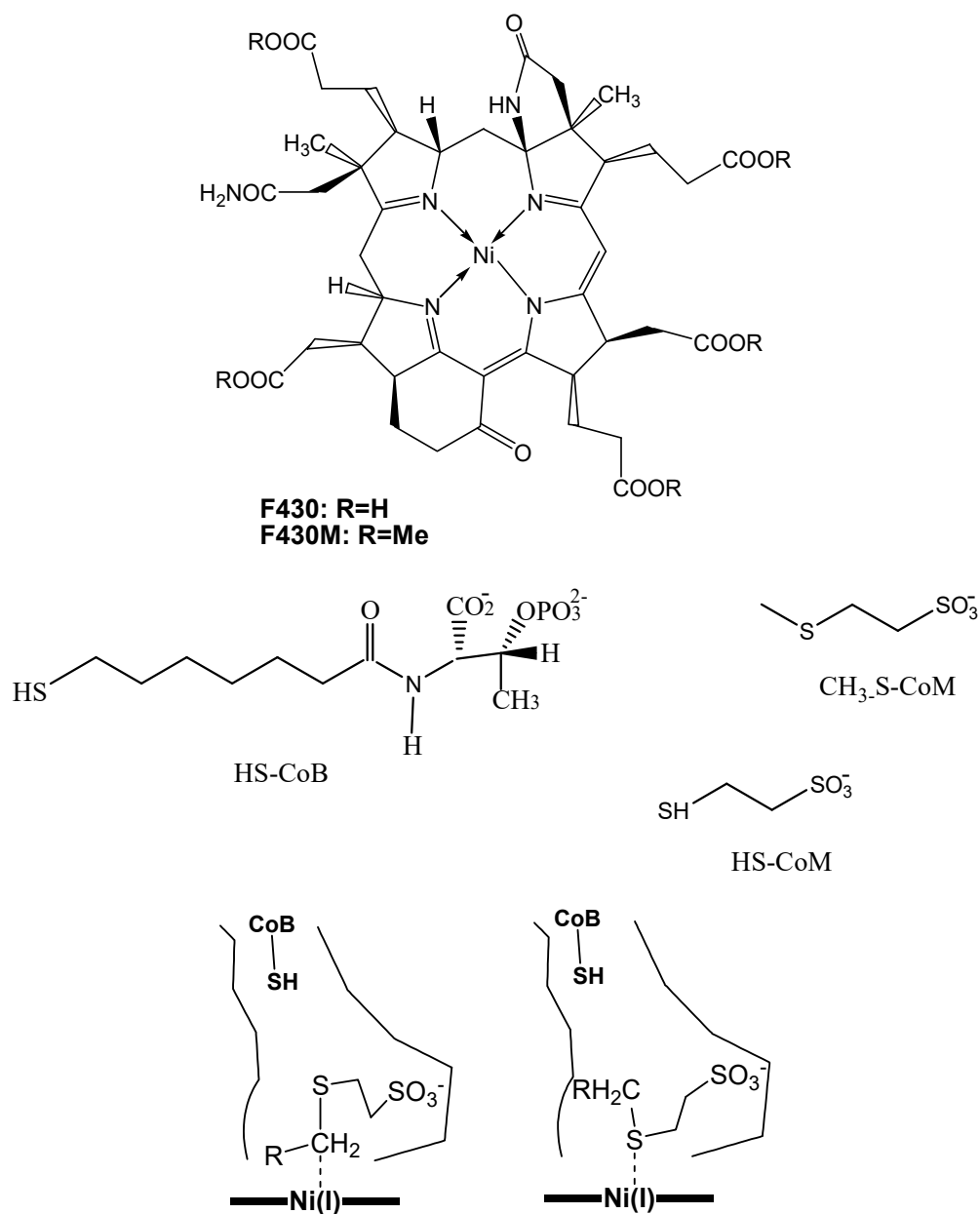
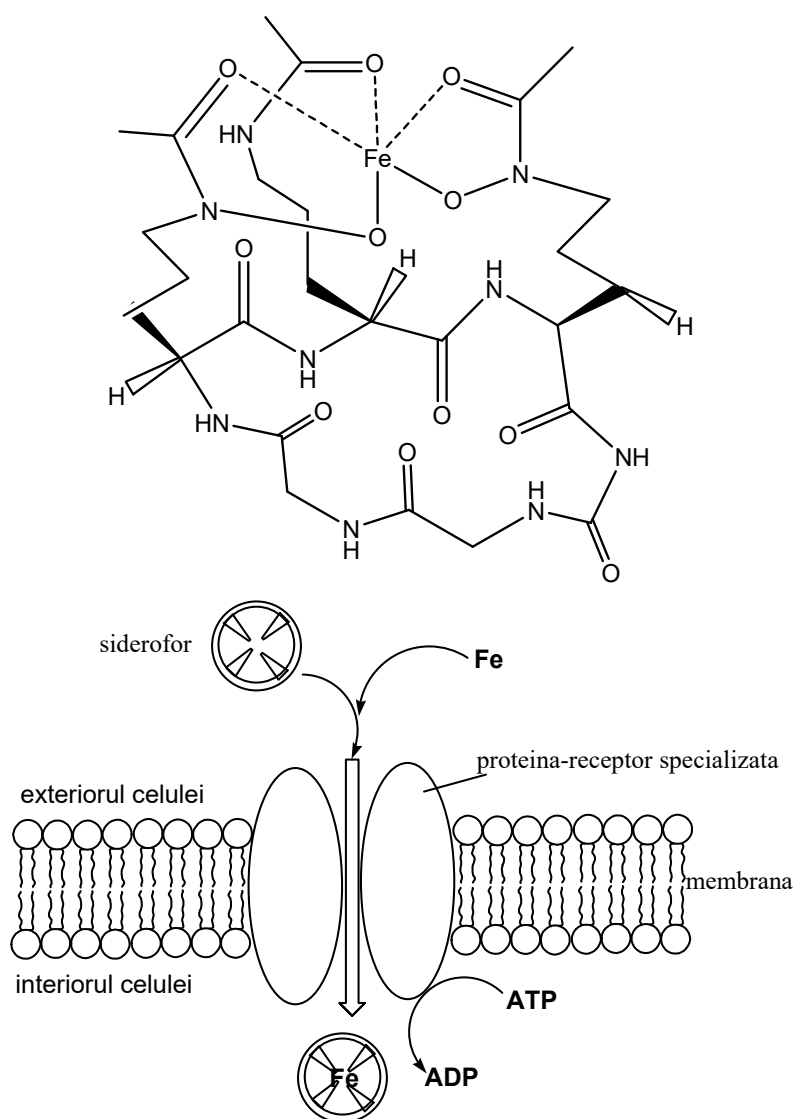


Figura 10-2. Coenzima F<sub>430</sub>, coenzimele accesorii, și cei doi posibili intermediari de reacție pentru reacția în care aceasta catalizează ultimul pas din sinteza bacteriană a metanului.

## 11. Molecule-traficant, molecule-depozit

Majoritatea metalelor devin, la anumite concentrații, toxice pentru organismele vii, deși foarte multe dintre ele sunt utile sau chiar esențiale la concentrații mai mici. În acest context, există proteine și peptide dezvoltate special pentru a controla traficul cu metale. Astfel, sideroforii (o structură reprezentativă fiind ilustrată în Figura 11-1) sunt peptide secretate de unele bacterii în afara celulei cu scopul de a recruta molecule de fier; odată legat fierul, sideroforul este receptat de proteine membranare care recunosc selectiv forma coordinată cu metal și o transportă în interiorul celulei.



**Figura 11-1. Structura unui exemplu de siderofor, și principiul de funcționare al acestora.**

Transportul și stocarea metalelor nu sunt însă apanajul peptidelor de masă moleculară mică: în marea majoritatea a cazurilor aceste funcții sunt îndeplinite de proteine. Probabil cea mai cunoscută în acest sens este feritina, care are rolul de a depozita fierul. După cum pot ilustra capitolele anterioare, fierul prezintă reactivitate foarte variată și potențial periculoasă, astfel încât nu i se poate permite circulația în formă liberă în celulă. Feritina este o proteină multimerică, formată din 24 de monomeri ce au structura terțiară și cea primară foarte similare cu ale hemeritrinei (a se vedea Capitolul 3.2). După cum se arată în Figura 11-1, aceste 24 de unități proteice formează o structură sferică; în cavitatea din centrul acestei sfere se depozitează fierul sub forma de mineral – oxid de fier. Fierul este adus la feritină sub formă de Fe(II) – formă mai solubilă decât Fe(III) – și oxidat de către feritina cu ajutorul unui situs catalitic di-feros similar celui din hemeritrine. Agentul oxidant este oxigenul molecular; o proteină înrudită, miniferitina, folosește ca oxidant apa oxigenată.

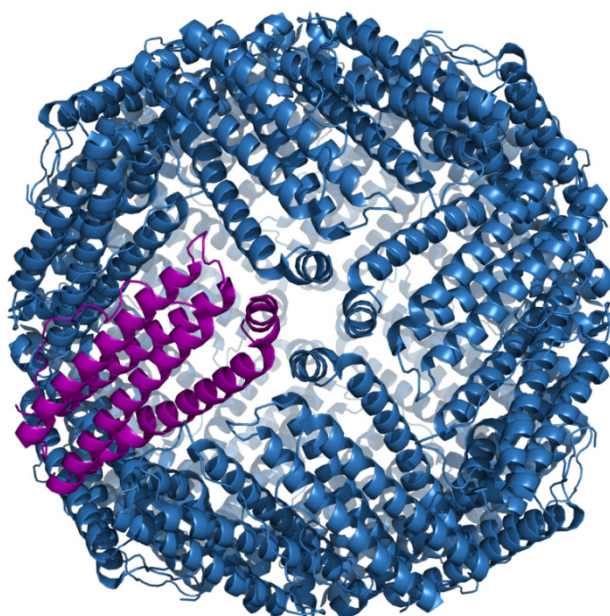
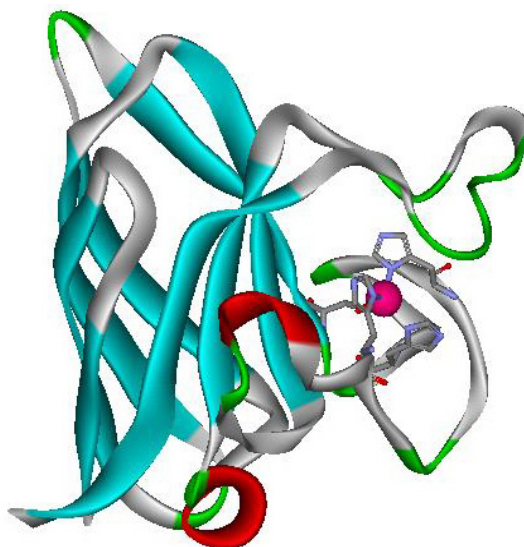


Figura 11-2. Structura feritinei.<sup>87</sup>

Situsul din feritină care se aseamănă cu cel de legare a centrului binuclear din hemeritrină este diferit în așa măsură încât feritina nu formează aducți *stabili* cu fierul la acest situs; fierul, trecând într-adevăr prin situsul de legare din miezul proteinei, este imediat oxidat la Fe(III) de către oxigenul molecular, după care migrează către cavitatea din centrul sferei delimitate de cei 24 de monomeri, unde se asociază sub formă de oxid și carbonat de fier, într-o structură similară ruginii. De aici, el poate fi eliberat la nevoie în urma unui proces reductiv. O proteină înrudită cu feritina, mini-feritina, are o masă moleculară mai mică decât feritina și folosește drept oxidant pentru Fe(II) nu O<sub>2</sub>, ci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Organismele noastre mai conțin și transferina, o proteină monomerică capabilă să transporte câte doi ioni de fier.

Și alte metale folosesc proteine transportoare sau de stocare. Astfel, metalotioneina, bogată în cisteină, este specializată în legarea metalelor cu caracter moale (mercur, cupru). Există de asemenea proteine specializate în inserarea metalului în proteine nou-sintetizate; structura unei astfel de proteine „dădacă” este ilustrată în Figura 11-3.



**Figura 11-3. O proteină care servește la inserarea metalului în situsul activ căreia îi este destinat (proteină „dădacă”).**

Se remarcă, drept trăsătură caracteristică, faptul că sfera de coordonare a metalului nu este complet saturată de proteină, astfel încât în prezența proteinei-țintă acesta să poată fi transferat, prin mecanisme care de obicei implică legarea la cupru a proteinei-țintă concomitent cu proteina donoare.

## 12. Hidrolaze, hidrataze

Atunci când folosesc metale, reacțiile de hidratare sau hidroliză, nefiind redox, tind să necesite la situsul activ al enzimei metale care nu sunt active redox. După cum se va vedea, zincul este candidatul ideal pentru această funcție, deși, în funcție de sistemul de liganzi, chiar și metale altfel active redox pot fi utilizate în reacții non-redox ca hidroliza sau hidratarea.

### 12.1. Enzime/proteine cu zinc

Figura 12-1 prezintă cele mai importante tipuri de situsuri active pe bază de zinc cunoscute până acum, menționând numele enzimelor reprezentative.

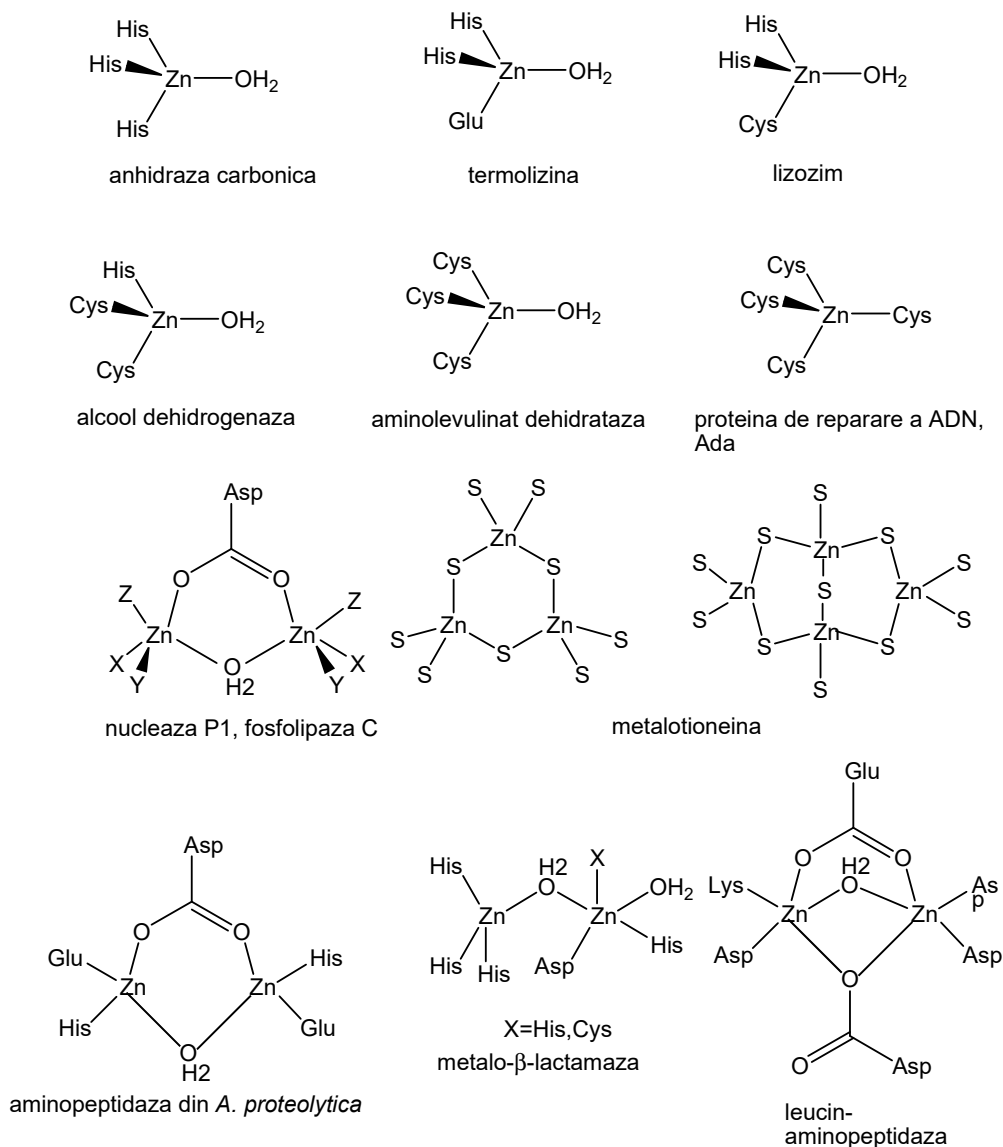


Figura 12-1. Situsuri de legare a zincului în proteine.

Așa cum se arată în Figura 12-2, există trei principale strategii care pot fi adoptate de o enzimă hidrolitică: simpla legare a apei pentru a o activa astfel încât aceasta să devină un nucleofil mai bun, legarea și (cu ajutorul matricii proteice) deprotonarea apei pentru a-i exacerba caracterul nucleofil transformând-o în hidroxid, sau, dimpotrivă, legarea la metal a substratului, astfel încât acesta să poată fi atacat mai eficient de către apă. Figura 12-3, Figura 12-4 și Figura 12-5 ilustrează modurile de acțiune a câtorva enzime ce folosesc aceste strategii.

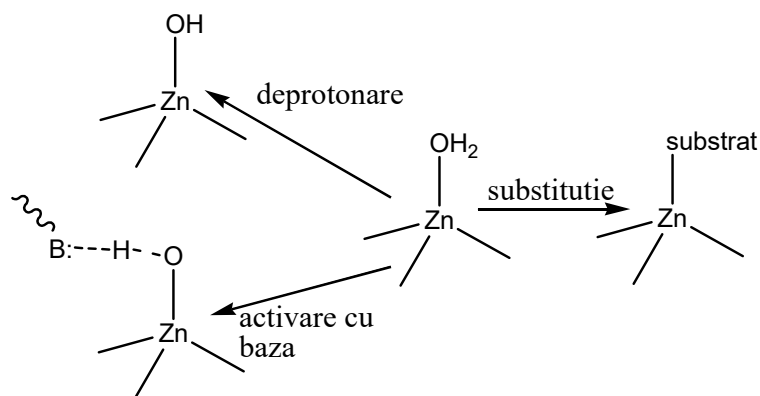


Figura 12-2. Strategii care pot fi adoptate de o enzimă hidrolitică pe bază de zinc.

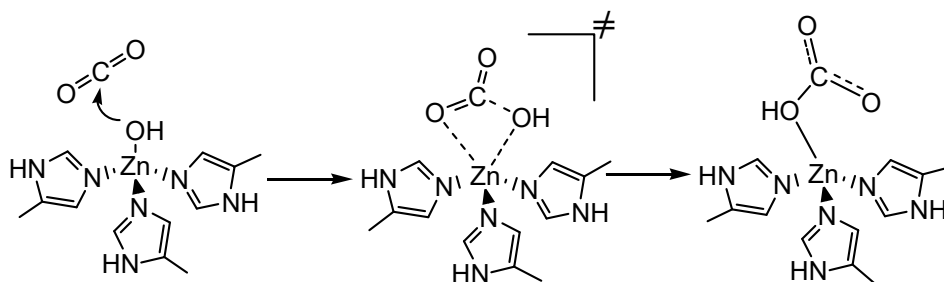


Figura 12-3. Mecanismul anhidrazei carbonice.

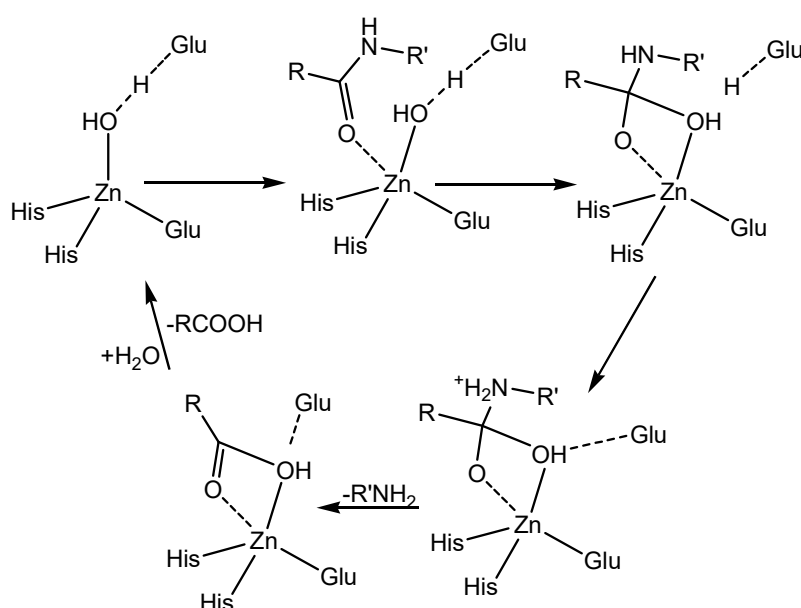


Figura 12-4. Mecanismul termolizinei.



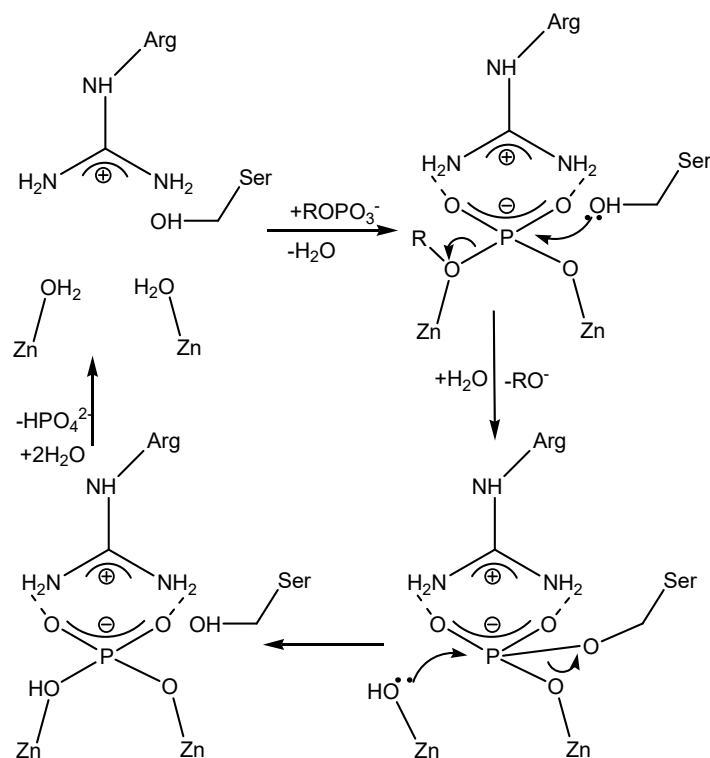


Figura 12-5. Mecanismul de acțiune al unei fosfataze cu zinc.

Deși non-hidrolitic în natura sa, principiul folosit în Figura 12-6 este întrucâtva similar celor folosite în reacțiile hidrolitice și prin urmare este discutat aici: sulfurul coordonat la zinc este activat pentru o reacție electrofilă, funcționând prin urmare ca transportor de grupări metil – fie în proteina Ada de reparare a ADN, fie în metionin sintetază.

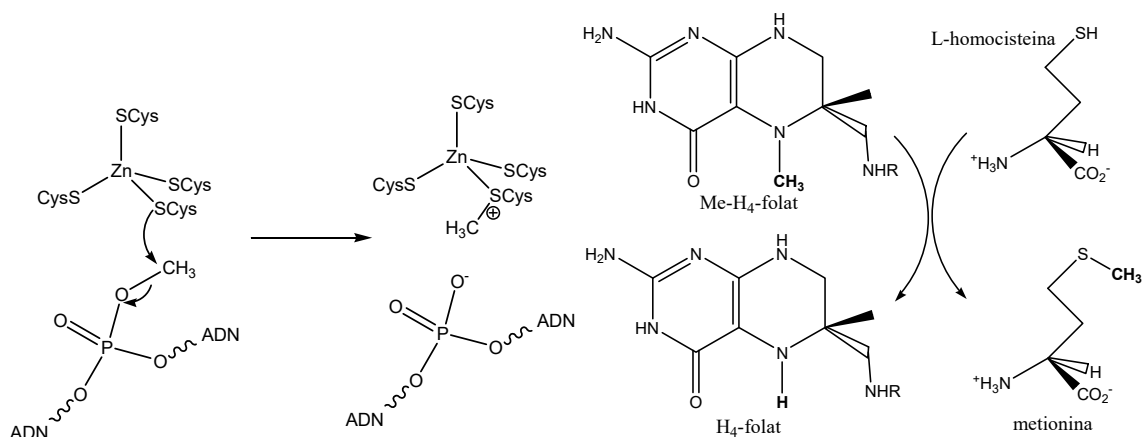


Figura 12-6. Mecanismul proteinei de reparare a ADN, Ada, și reacția catalizată după un principiu similar de metionin sintetază.

## 12.2. Hidrolaze sau hidrataze cu alte metale decât zincul

Figura 12-7 ilustrează situsul activ al nitril hidratazei cu cobalt; deși cobaltul este în principiu un metal activ redox, sistemul de liganzi din jurul său, purtând toți sarcini negative, mută potențialul redox al metalului în afara zonei accesibile celulei, păstrând enzima în forma

Co(III), practic inactiv redox. Se remarcă, în acest sens, prezența a doi liganzi amido provenind din legături peptidice  $-\text{CO}-\text{NH}-$  deprotonate la azot – o trăsătură structurală unică acestei clase de enzime; tot unic este și modul de coordonare a două dintre cisteine, care se prezintă sub formă de acid sulfenic și respectiv sulfinic, așa cum se vede în Figura 12-7. Un situs practic identic (cu excepția metalului) al nitril hidratazei cu fier, cu observația că aici enzima este produsă de celule într-o formă nereactivă, cu fierul blocat sub forma unui aduct  $\text{Fe(III)}-\text{NO}$ , care este activat prin eliberare de NO la lumină. Figura 12-7 prezintă și mecanismele propuse pentru nitril hidrataze.<sup>88</sup>

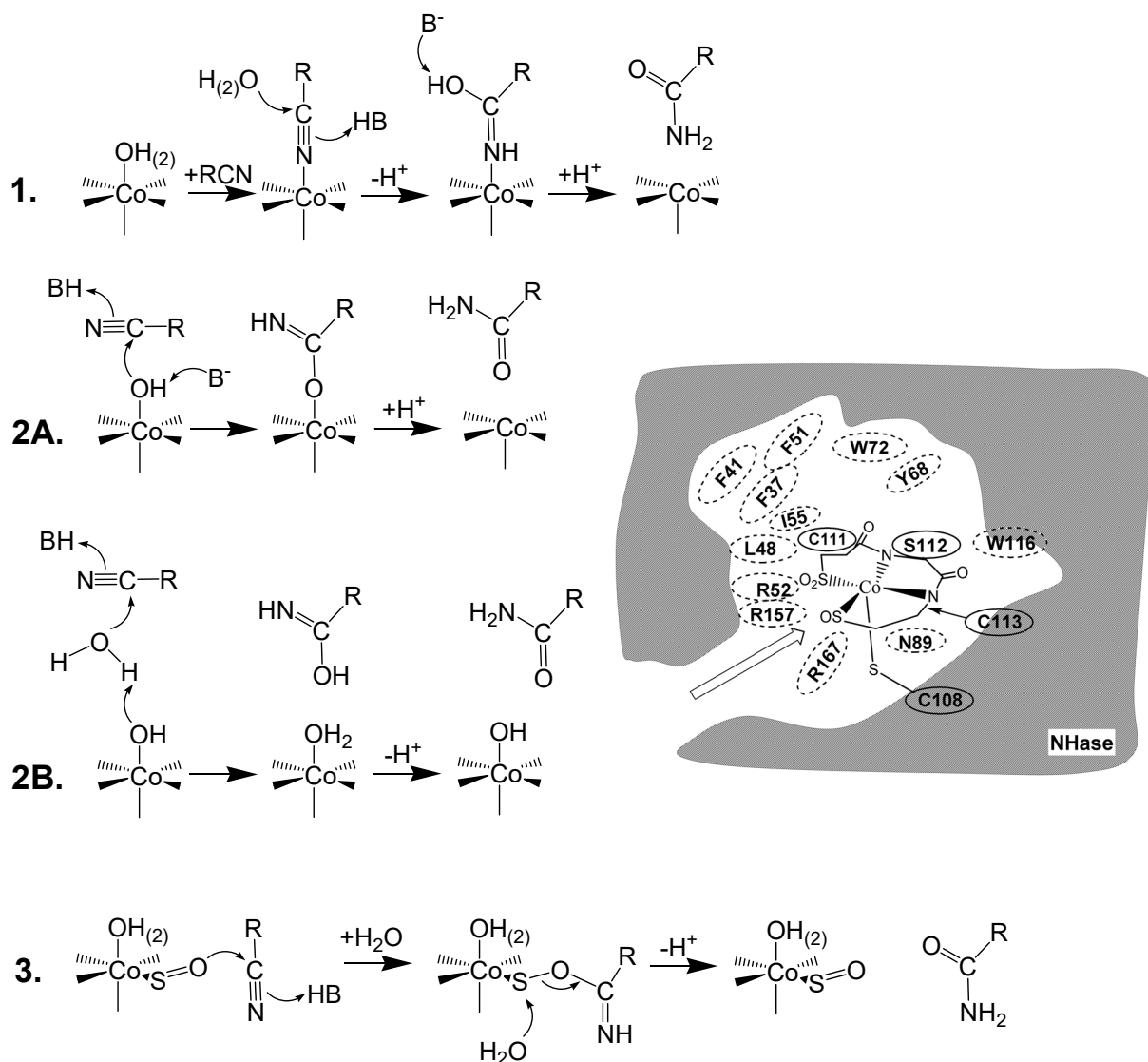
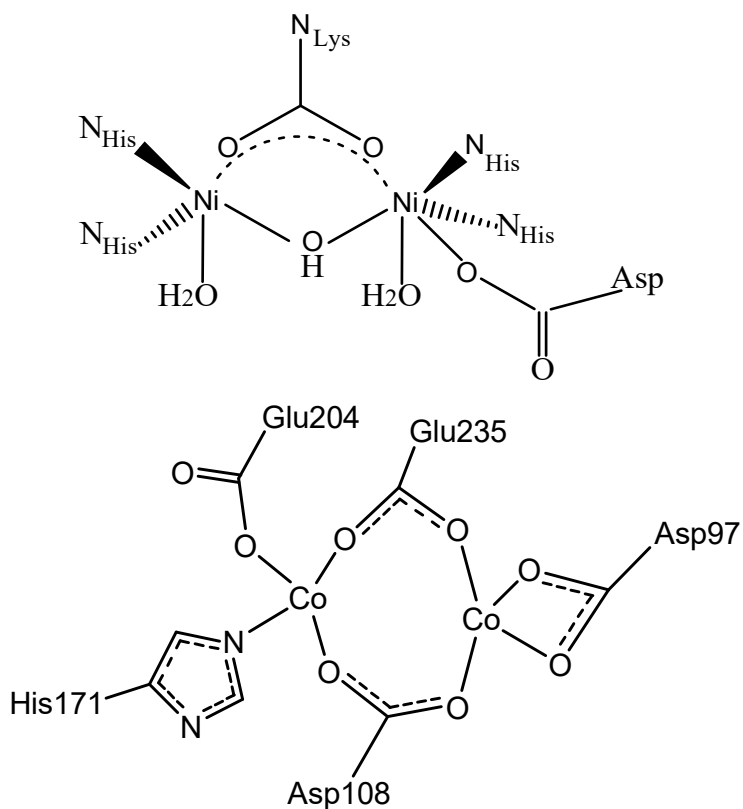


Figura 12-7. Structura situsului activ și mecanismele propuse pentru nitril hidrataza cu cobalt.

Un alt exemplu de hidrolază pe bază de cobalt este aminopeptidaza, cf, Figura 12-8.

Una dintre metaloproteinele cele mai cunoscute este ureaza. Aceasta catalizează hidroliza ureei la amoniac și  $\text{CO}_2$ , și se găsește în organisme precum bacteria *Helicobacter pylori*, care colonizează mediul extrem de acid din stomac și este un factor cauzator de boală. Rolul ureazei este de a genera amoniac, măbind local pH-ul și permițând bacteriei să supraviețuiască mai eficient. Situsul activ al ureazei conține un centru binuclear de nichel, cf. Figura 12-8.



**Figura 12-8. Siturile active ale aminopeptidazei cu cobalt și ureazei.**

Nu în ultimul rând, pe aceleași principii după care funcționează hidrolazele cu zinc se întâlnesc și hidrolaze ce folosesc metale alcaline și alcalino-pământoase – inclusiv ribozimele (structuri catalitice folosite la prelucrarea ARN și alcătuite din ARN, făcând apel la potasiu la situsul activ). Pe lângă acestea, există și o gamă foarte largă de hidrolaze care nu folosesc deloc metale.<sup>1</sup>

### 13. Elemente de chimie bio-organometalică. Vitamina B<sub>12</sub>

Vitamina B<sub>12</sub> sau cobalamina (Figura 13-1) este singura vitamină care conține un metal. Proprietatea ei unică este de a accesa o stare formală de oxidare foarte joasă la metal, Co(I), în care este capabilă de a forma legături cobalt-carbon. Legăturile metal-carbon sunt în principiu apanajul așa-numitei chimii organometalice, și sunt de obicei distruse de apă și oxigen; cobalamina este o excepție notabilă în acest sens, și a stat la baza definiției unui nou domeniu al chimiei – chimia bio-organometalică.<sup>89</sup>

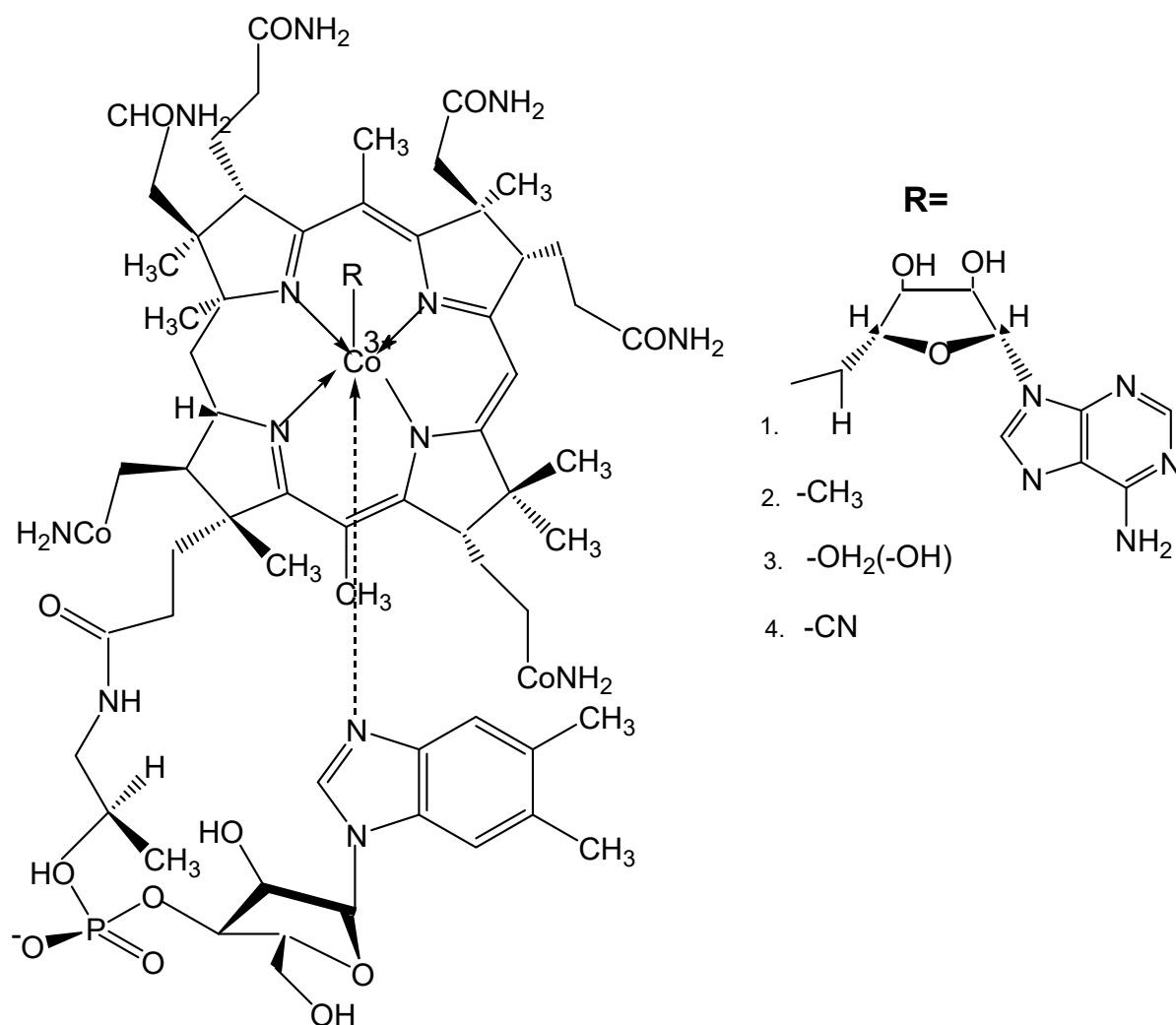
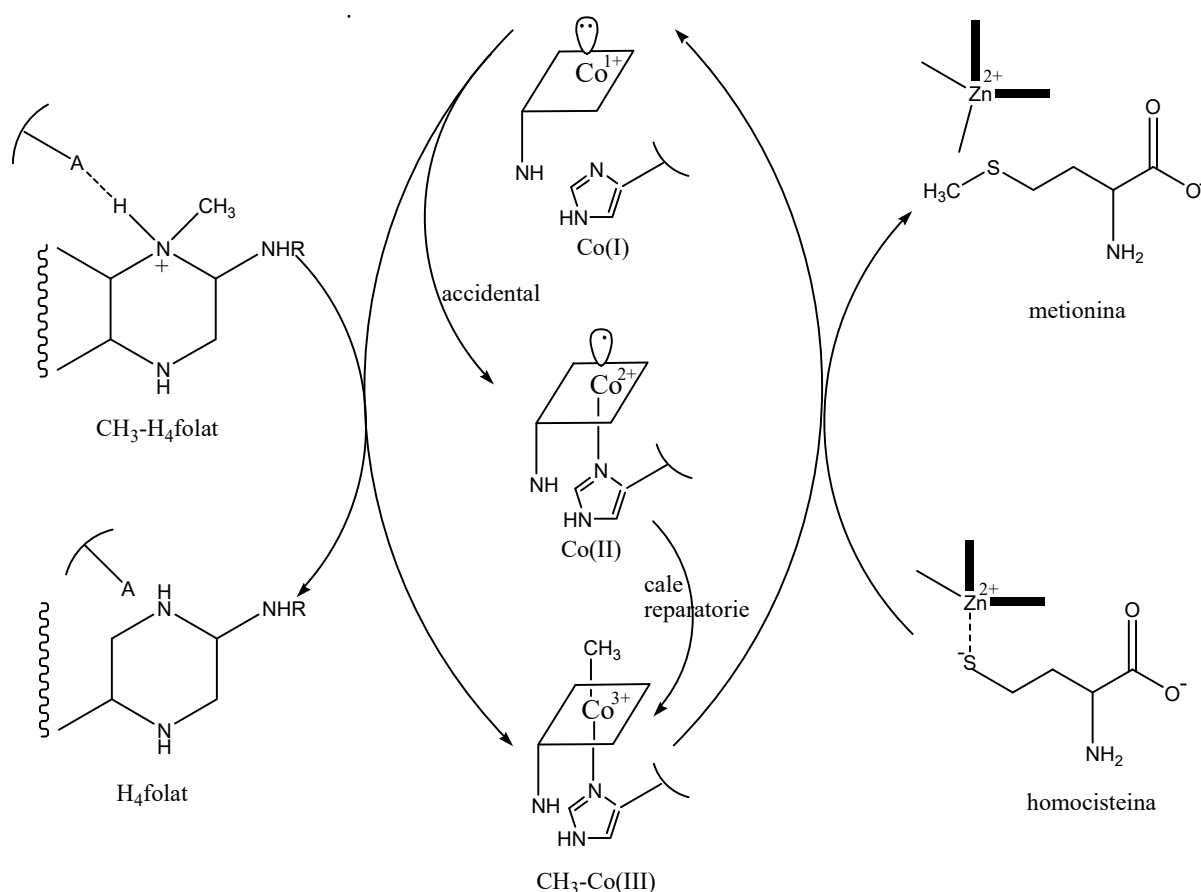


Figura 13-1. Structura cobalaminei.

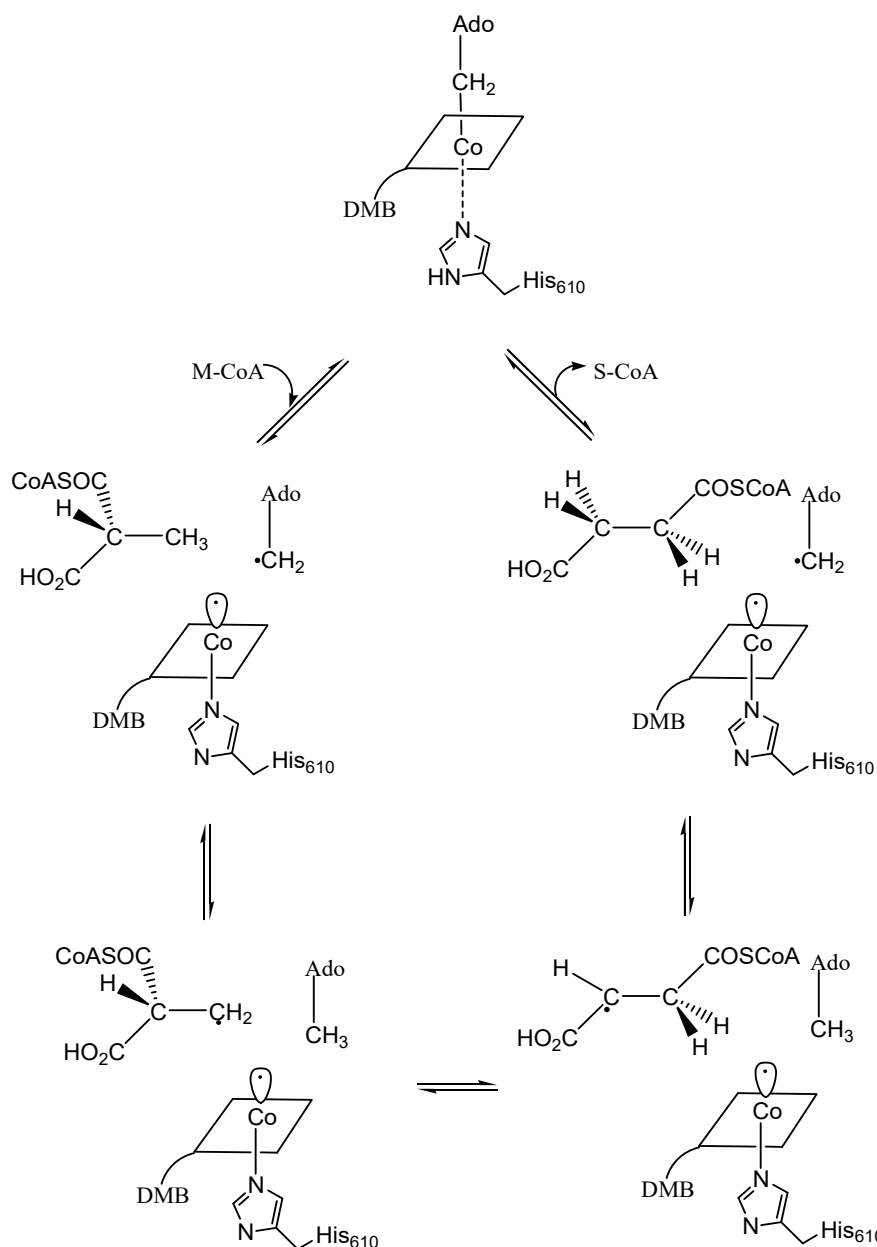
Dintre liganzii posibili („R”), cianura nu are relevanță biologică, apărând doar la purificare ca impuritate rezultată din cărbunele activ.

Reacțiile catalizate de vitamina B<sub>12</sub> gravitează în jurul celor două tipuri de reacții în care se poate angaja prin (clivarea legăturii cobalt-carbon: heteroliză (reacții de transfer de grupări metil) sau homoliză (reacții de izomerizare)). Cele două mecanisme de reacție sunt ilustrate în Figura 13-2 și Figura 13-3.

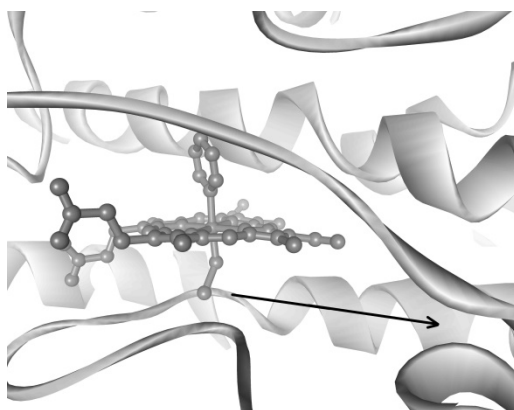
Deși chimia „bioorganometalică” este în mare măsură restrânsă la cobalamină, există și alte tipuri de compuși metal-carbon. Figura 13-4 ilustrează un exemplu în acest sens – un aduct cu Fe-fenil al unui citocrom P450.<sup>90</sup>



**Figura 13-2. Mecanismul metionin-sintetazei, un exemplu de enzimă B<sub>12</sub>-dependentă implicând heteroliza legăturii carbon-cobalt. Acesta implică doar formele Co(I) și Co(III); forma Co(II) poate apărea accidental, și Figura ilustrează faptul că există mecanisme enzimatice de a reîntoarce metalul într-o stare de oxidare din cadrul ciclului catalitic.**



**Figura 13-3. Mecanismul metilmalonil coenzim A mutazei, un exemplu unde este esențială clivarea heterolitică a unei legături carbon-cobalt.**



**Figura 13-4. Un aduct bioorganometalic ce nu implică vitamina B<sub>12</sub>: citocromul P450 complexat cu fenil.**

Figura 13-5 face un rezumat al celor mai cunoscute cazuri de legături metal-carbon la situsurile bioanorganice.

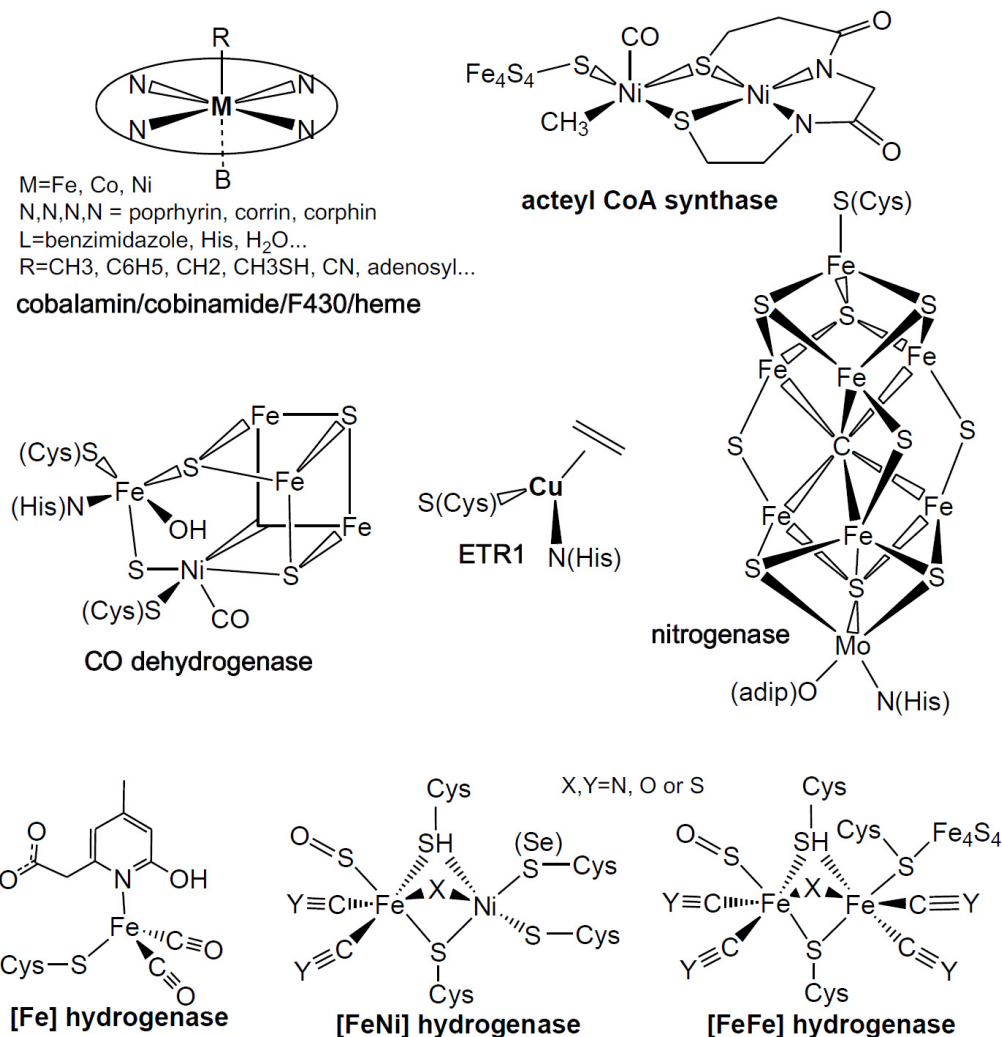


Figura 13-5. Situri reprezentative ale metaloenzimelor implicate în legături metal-carbon.

În timp ce corina poate fi văzută într-o oarecare măsură ca o versiune redusă/hidrogenată (și mai scurtă cu un carbon) a unei porfirine, cu doar 6 legături duble rămase în comparație cu un număr dublu în porfirină, corfina este și mai redusă, cu doar 5 legături duble rămase. Coenzima F<sub>430</sub> conține un centru Ni<sup>2+</sup> complexat de o corfină și se știe că este implicat în etapa finală a reacțiilor de generare a metanului în bacterii.

Mecanismul acestei etape finale implică o stare de oxidare a metalului neobișnuit de scăzută (Ni<sup>+</sup>) și, eventual, o interacțiune Ni-metil într-un efort de a transforma o grupare metil activată de tiol în metan. Legături Ni-carbon sunt, de asemenea, observate în situsurile active acetil CoA sintază și CO dehidrogenază.<sup>91</sup> Complecșii fier-porfirină (hemurile) sunt cunoscuți a se angaja în formarea legăturii metal-carbon, cu o gamă largă de complexe hemoproteice fier-aryl și fier-alk(en)il caracterizate experimental (inclusiv cel puțin o structură cristalină proteică). Se crede că receptorul plantei ETR1 prezintă un complex tranzitoriu de Cu-etilenă.<sup>90-92</sup>

## 14. Proteine implicate în fotosinteză

Fotosinteza are ca scop sinteza de materie organică folosind  $\text{CO}_2$  ca materie primă; procesul fiind endergonic, se folosește energia luminoasă pentru a-l susține. După cum se ilustrează în Figura 14-1, seria de reacții din cadrul fotosintezei se împarte în două segmente separate în spațiu și timp. În prima parte are loc receptarea energiei luminoase și transformarea ei într-o formă accesibilă celorlalte compartimente ale celulei – NADPH, ATP. Acestea sunt reacțiile care necesită direct lumina. A doua serie de procese se poate desfășura și la întuneric, și implică reacția  $\text{CO}_2$  cu o glucidă, transformându-l astfel în materie organică.

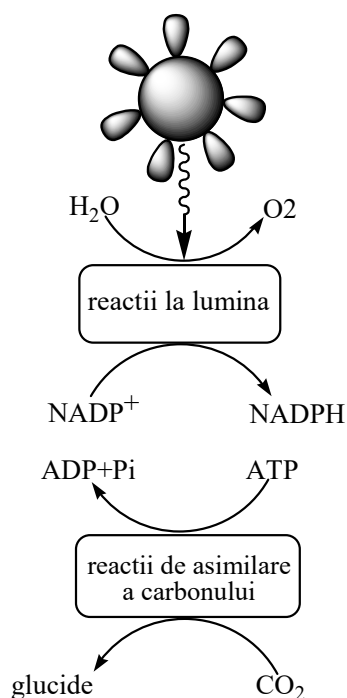
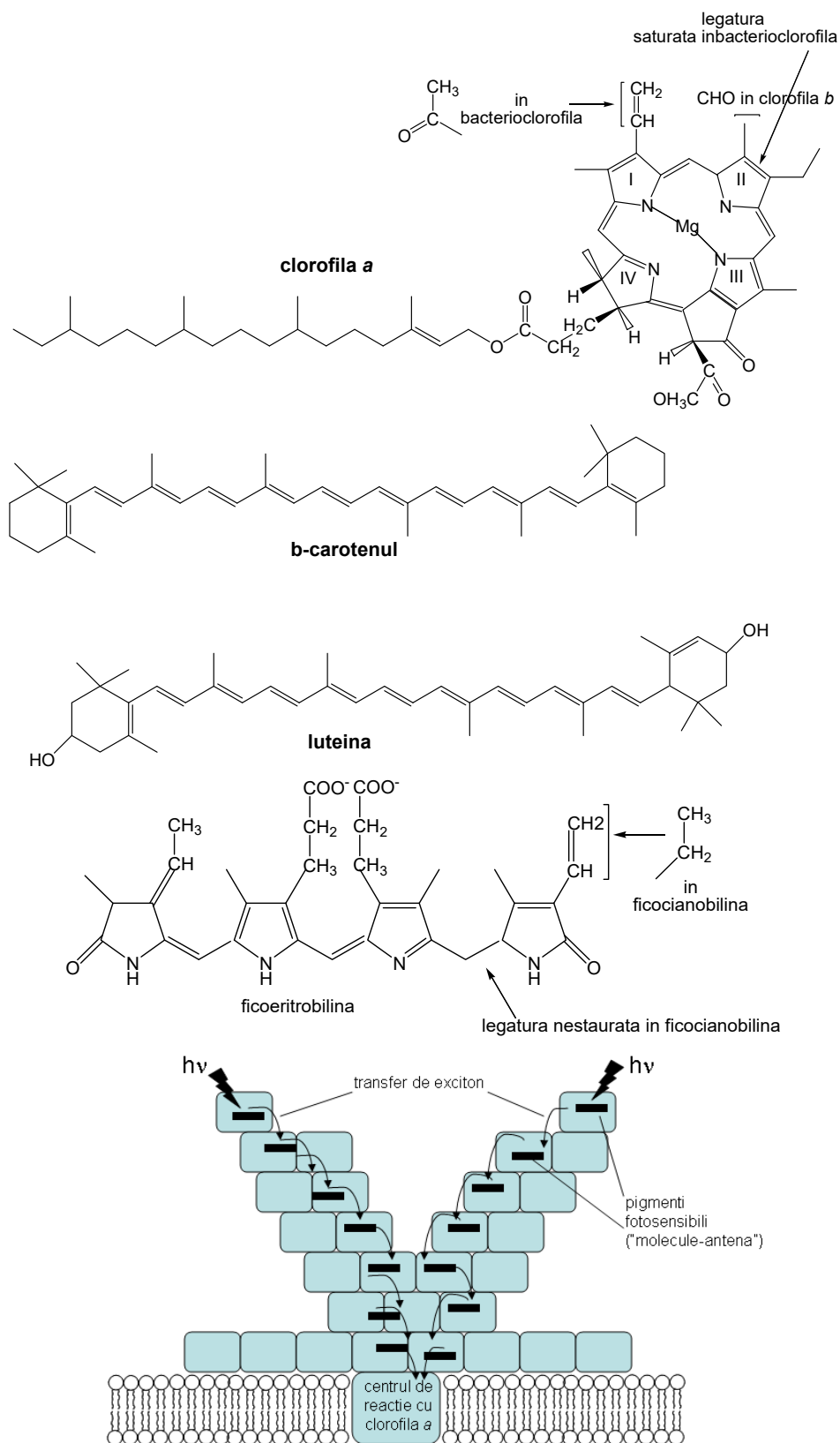


Figura 14-1. Seria de procese implicate în fotosinteză.

Captarea energiei luminoase are loc în cloroplastă, o organită celulară similară mitocondriei prin prezența a două membrane (externă și internă) și prin prezența a numeroase proteine membranare (a se vedea Capitolul 6 pentru o discuție a importanței acestui tip de structură). În fapt, proteinele responsabile pentru captarea fotonilor sunt și ele membranare. Ele conțin grupări non proteice capabile de a absorbi fotoni (a se vedea Figura 14-2), caracterizate prin prezența de legături duble conjugate care fac ca orbitalul LUMO (lowest unoccupied molecular orbital – orbitalul molecular de energie minimă dintre cei care nu sunt încă ocupați de electroni) să aibă energie mai joasă și prin urmare să fie nevoie de fotoni de energie cât mai joasă pentru a promova un electron dintr-un orbital ocupat în LUMO. Datorită legăturilor duble conjugate toate sistemele din Figura 14-2 sunt colorate; cele mai celebre dintre ele sunt fără îndoială clorofilele, care dau culoarea verde a majorității frunzelor de plantă – însă vom remarca faptul că moleculele „antennă” din Figura 14-2 au evoluat pentru a acoperi întregul spectru al luminii vizibile (~400-800 nm,



așa cum se arată în Tabelul 14-1), permițând astfel, prin folosirea combinată a mai multor astfel de pigmenți, utilizarea fotonilor de orice energie din acest domeniu.



**Figura 14-2. Molecule specializate în receptarea luminii în cloroplaste, și o ilustrare schematică a traseului urmat de foton și apoi de exciton prin centrul de reacție.**

**Tabelul 14-1. Regiuni cu maxime de absorbție pentru diverși pigmenți utilizați în fotosinteză.**

Compusul	Domeniu optim de absorbție (nm)
clorofila <i>a</i>	400-450, 650-700
clorofila <i>b</i>	430-500, 630-680
luteina	400-500
ficocianina	500-700
ficoeritrina	450-600
B-carotenul	400-500

În cele ce urmează, se va urmări traseul energiei, de la stadiul de foton la cel de ATP. Fotonul va fi absorbit de una din moleculele-antena din complexul proteic membranar denumit sugestiv „centru de reacție”. Acest fenomen va duce la promovarea unui electron în interiorul pigmentului, dintr-un orbital ocupat într-unul neocupat, creând astfel o stare excitată din punct de vedere al structurii electronice. Această stare se va întoarce rapid la starea inițială (fundamentală), eliberând energie; această energie va fi preluată de un pigment similar primului și din imediata sa vecinătate, care va suferi același fenomen de trecere într-o stare excitată. În continuare, acest al doilea pigment va reveni la starea fundamentală, transmițând mai departe energia unui al treilea pigment, lanțul continuând în aceeași modalitate. Fenomenul este descris ca „transfer de exciton” – pentru că, în mod aparent, ceea ce călătorește de la un pigment la altul este starea excitată. Excitonul este transmis pe traseul astfel discutat și ilustrat și în Figura 14-2 cu o serie de săgeți roșii, până când ajunge la o așa-numită „pereche specială” – un situs ce conține două clorofile aflate foarte aproape una de cealaltă. Starea excitată a acestei perechi speciale are proprietate deosebită de a avea un potențial redox mult mai negativ decât starea fundamentală, astfel încât ea cedează foarte ușor un electron unui partener redox din afara proteinei. Pașii care urmează pot fi întrezăriți prin comparație cu fenomenele descrise în Capitolul 6 (Respirația): urmează ca energia electronului să fie convertită într-o formă utilizabilă în alte părți ale celulei – preferabil ATP. Figura 14-3 prezintă partenerii implicați în procesele fotosintetice din două tipuri de bacterii. Într-unul din tipurile de bacterii (stânga în Figura 14-3), electronul este transmis printr-un lanț de proteine și transportori (similar ca și concept lanțului transportor de electroni din mitocondrii), care, în mod important, conține o proteină de tip citocrom capabilă să genereze un gradient de protoni pe seama energiei electronului (transferând așadar, așa cum făceau Complecșii I, III și IV, protoni dintr-o parte în alta a membranei interne). Excesul de protoni astfel generat este apoi folosit de o ATP-sintetază aflată în aceeași membrană. Electronul provenit din „perechea specială”, odată folosit pentru producerea de gradient de protoni, este returnat la punctul de plecare, ceea ce permite reluarea ciclului de reacție cu un nou foton. Pe de altă parte alte tipuri de bacterii folosesc un al doilea tip de strategie, după cum se ilustrează în partea dreaptă a Figura 14-3. Aici electronul poate fi extras ireversibil din centrul de reacție, fiind depozitat pe molecula transportor, NADH. În compensație, centrul de reacție este obligat să găsească o sursă comodă și eficientă de electroni pentru a regenera centrul de reacție; nu există în principiu alte restricții asupra naturii donorului de electroni la acest punct; bacteriile din Figura 14-3 folosesc astfel  $H_2S$ , dar alte organisme pot folosi și alte surse, ca de exemplu arsenitul.

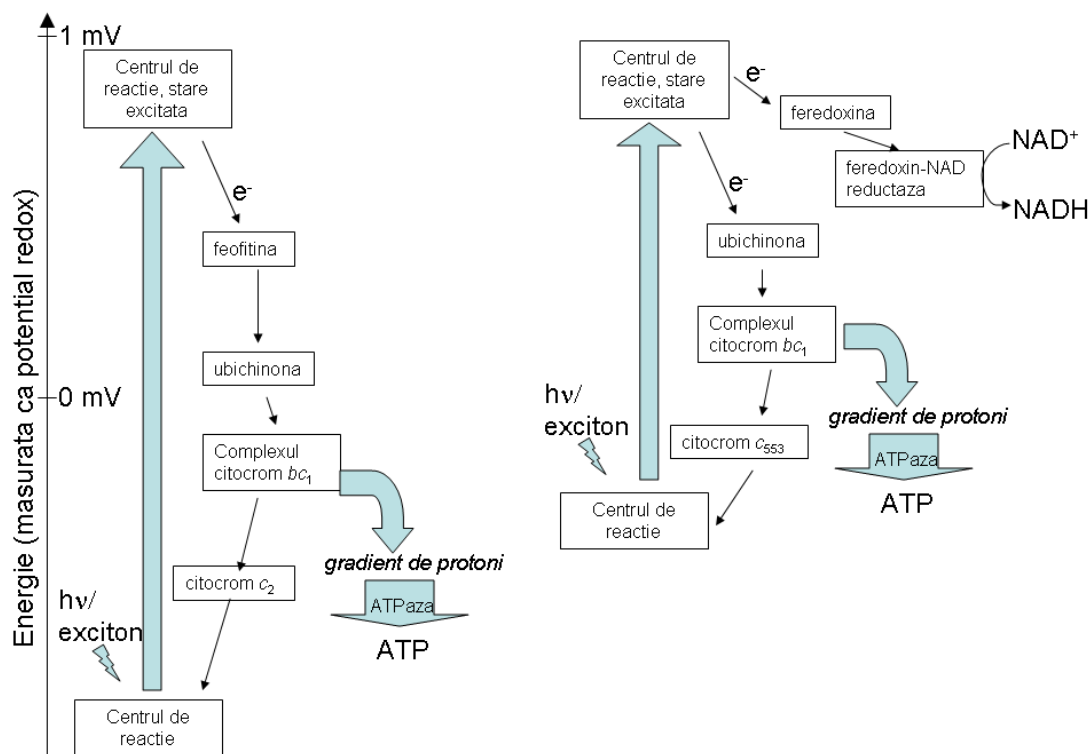


Figura 14-3. Tipuri de sisteme fotosintetice din bacterii.

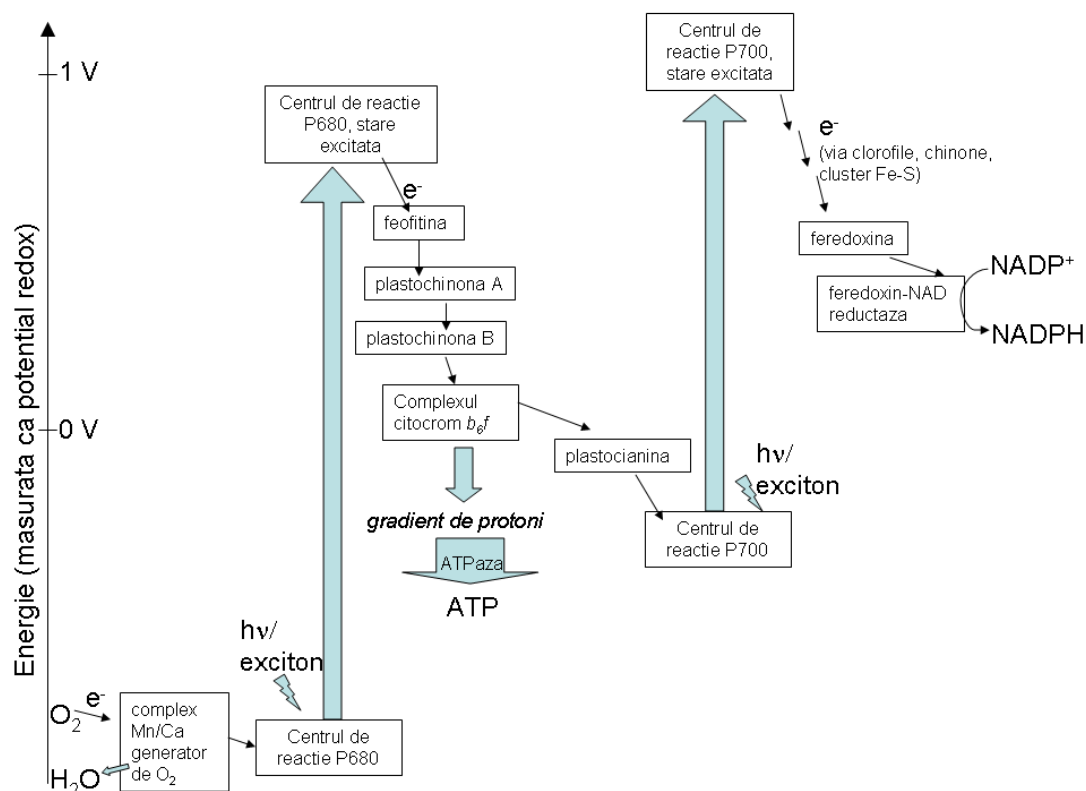
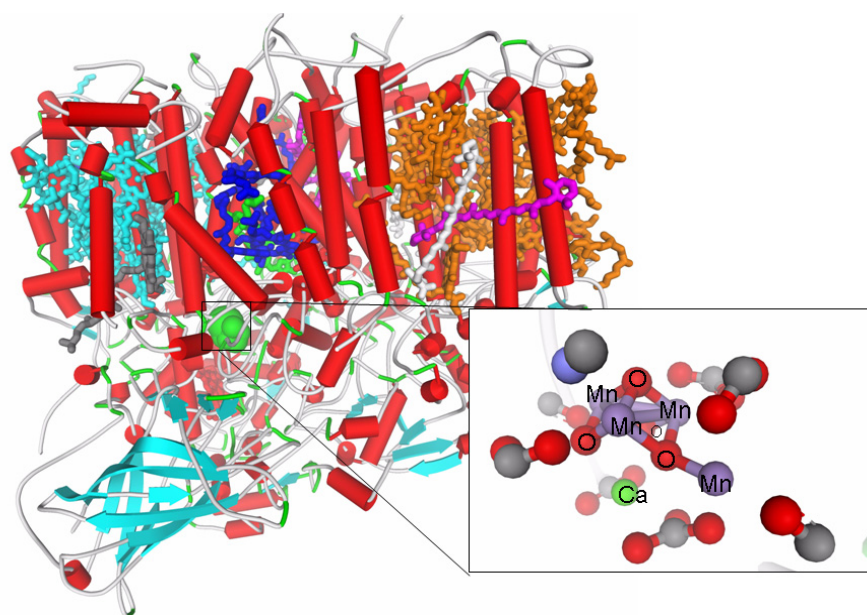


Figura 14-4. Sistemul fotosintetic din plante.

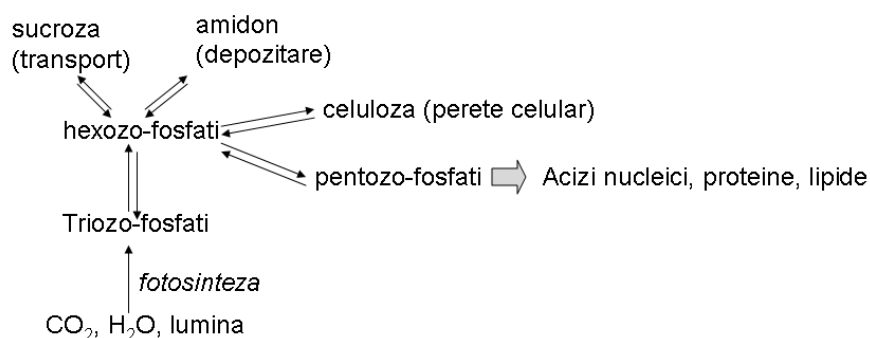
Plantele folosesc ambele strategii ilustrate pentru organismele bacteriene de mai sus, așa cum se arată în Figura 14-4. Se găsesc astfel aici două fotosisteme, care permit atât generarea de gradient de protoni și prin urmare de ATP, cât și generarea de NADPH. Electronul necesar

pentru a regenera centrul de reacție este în acest caz furnizat de molecula de apă, care în decursul acestui proces este oxidată la oxigen molecular. Proteina responsabilă pentru acest proces folosește un cluster de mangan și calciu, a cărui structură, ilustrată în Figura 14-5, conține un cub incomplet în ale cărui colțuri sunt așezați alternativ atomi de mangan și oxigen, cu un atom de calciu așezat ușor în afara unuia dintre colțuri în locul unui atom de mangan; un al patrulea atom de mangan este așezat în afara cubului; manganul și cobaltul sunt conectate de matricea proteică prin aminoacizi bogați în oxigen (aspartat, etc.). Reacția în sine (oxidarea apei cu producere de oxigen), la fel ca cea din citocrom *c* oxidază (vezi Capitolul 6), este complicat de realizat, existând riscul eliberării de intermediari de reacție extrem de toxici – radical hidroxil, superoxid, ori apă oxigenată.



**Figura 14-5. Centrul de reacție unde are loc oxidarea apei la oxigen molecular în cadrul fotosintezei. Reprezentate în model „stick” sunt numeroasele grupări prostetice active redox, altele decât clusterul Mn-Ca – clorofile, hem, etc – prezente în aceeași proteină.**

Reacțiile din partea a doua a fotosintezei (cele desfășurate „la întuneric”) necesită o singură metaloenzimă importantă, care a fost discutată deja în Capitolul 73 – Rubisco. Figura 14-6 prezintă lanțul de reacții care duce la încorporarea  $\text{CO}_2$  în metabolismul glucidic, și care formează subiectul textelor de biochimie clasică.

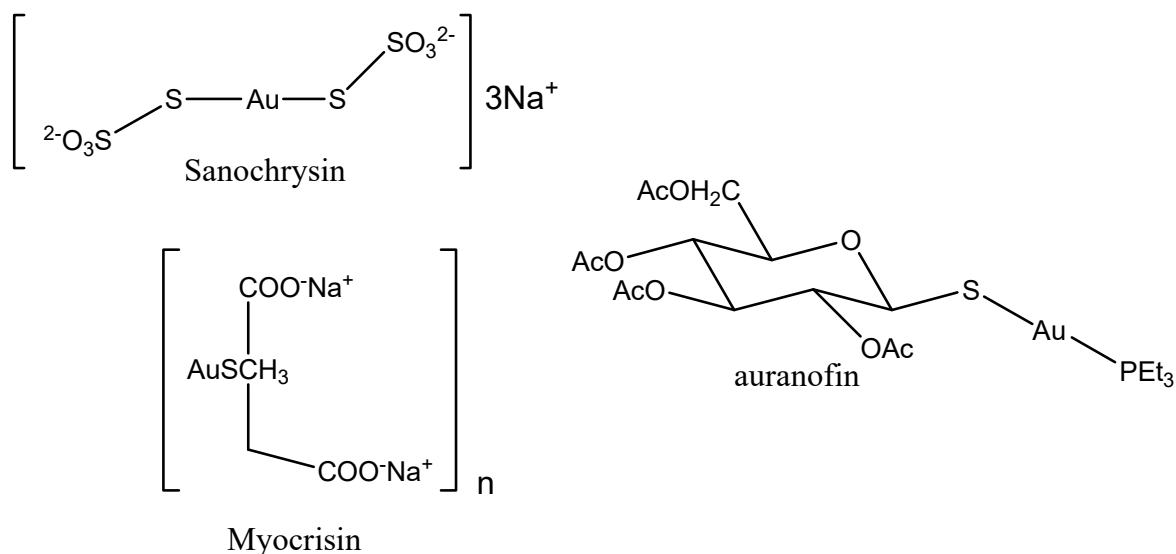


**Figura 14-6. Lanțul de reacții de asimilare a carbonului din  $\text{CO}_2$  în plante, folosind energia extrasă din cea luminoasă în etapele anterior discutate în capitolul de față.**

## 15. Metalele în medicamente și în agenți de diagnostic medical

Utilizările metalelor în medicină și aspectele legate de toxicitate sunt foarte diverse; se vor discuta aici câteva dintre cele mai cunoscute.

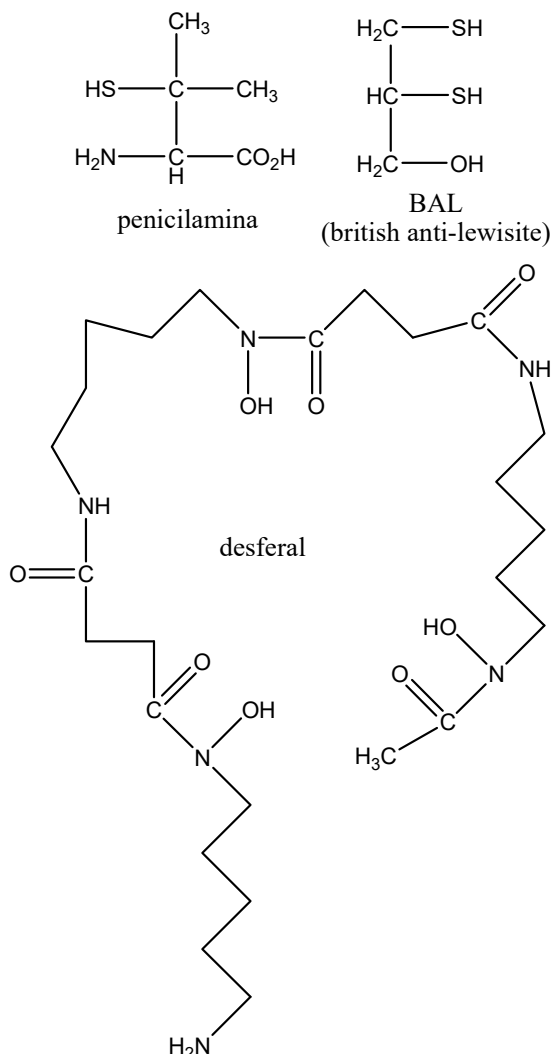
Printre cele mai vechi metale cunoscute ca având utilizări medicale se numără aurul și argintul, folosite de câteva mii de ani, probabil la început în combinație cu utilizări magice/mistice. Coincidența face ca ceva mai târziu, acum cca 200 de ani, primul medicament pe bază de metal cu o structură chimică determinată și cunoscută să fie un complex de aur –  $K[Au(CN)_2]$  cu proprietăți antibacteriene. În zilele noastre, complecși de aur sunt folosiți de exemplu pentru artrita reumatoidă (ca de exemplu cei din Figura 15-1).



**Figura 15-1. Medicamente pe bază de aur. Sunt listate denumirile comerciale în engleză. După cum se vede, în unele cazuri compoziția chimică nu este cunoscută în toate detaliile.**

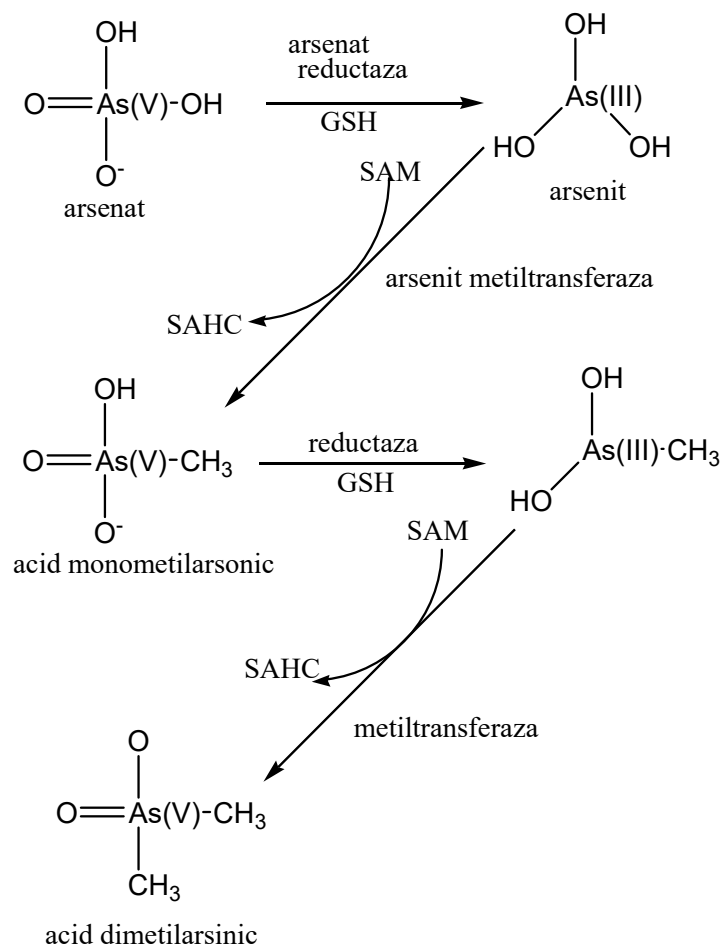
Un alt metal cu o istorie îndelungată în medicină este fierul; necesitatea folosirii de exces de fier în alimentație pentru a combate anemia era recunoscută încă de acum ~1200 de ani. Pe de altă parte, boli cauzate de excesul de metale (fier sau altele, precum cupru ori mercur) sunt azi bine cunoscute, și există compuși disponibili comercial care sunt utilizați în tratamentul medical al acestor boli (Figura 15-2). Un alt agent chelatant al fierului (dar care funcționează în mod similar și cu cuprul) este peptida numită bleomicină: aceasta, are proprietatea de a se lega necovalent de ADN, aducând astfel și metalul în vecinătatea acidului nucleic; ceea ce urmează este o dezlănțuire a activității oxidative a acestor metale, în moduri similare cu cele expuse în Capitolul 4; în cazul în care ingredientele sunt Fe(II), o sursă de electroni (ca de exemplu acidul ascorbic) și oxigenul molecular (toate trei universal prezente într-o celulă vie), sistemul chimic rezultat de numește „reacție Fenton”, și implică, după modelele din Capitolul 4, generarea de radicali liberi și stări de valență înaltă la fier, toate cu potențial distructiv ridicat

și prin urmare eficiente în a degrada biomolecule precum ADN-ul. Bleomicina este folosită, din acest motiv, ca medicament anti-cancer.

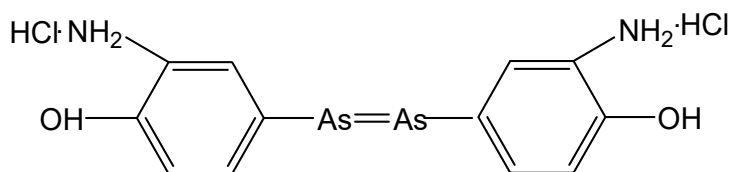


**Figura 15-2. Agenți de chelatare cu utilizare medicală împotriva excesului de fier (desferioxamina) sau cupru (penicilamina).**

Încadrat în general ca metaloid (element care prezintă o parte dintre proprietățile metalelor, fără a fi în sine metal), arsenul formează compuși anorganici extrem de toxici (ca de exemplu trioxidul de arsen). Folosirea lor ca otrăvuri de-a lungul istoriei este cunoscută și a fost popularizată probabil în cea mai mare măsură de familia italiană Borgia, în Evul Mediu. Ținta primară a arsenului sunt grupările tiolice, față de care are o afinitate deosebită. Independent de acest fapt, organismele au dezvoltat mecanisme de detoxifiere a arsenului, ilustrate în Figura 15-3. Există pe de altă parte și utilizări medicale ale arsenului; salvarsanul, descoperit de Ehrlich acum cca 100 de ani ca medicament împotriva sifilisului (Figura 15-4), a intrat în istorie ca primul medicament generat în urma unui studiu sistematic ce corela structura chimică și activitatea biologică (domeniu azi separat al biochimiei – SAR, Structure-Activity Relationships). Trioxidul de arsen, în cantități controlate, are potențial terapeutic împotriva unor forme de cancer.



**Figura 15-3. Mecanisme enzimatice de reducere a toxicității arsenului.**  
**GSH=forma redusă a glutatationului (o peptida pe baza de cisteină, acționând ca agent reducător prin intermediul grupărilor SH);**  
**SAM = S-adenozil metionina.**

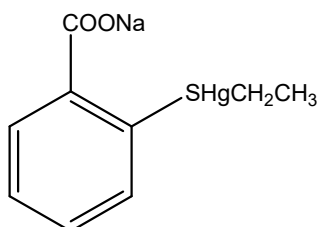


**Figura 15-4. Structura propusă inițial pentru arsfenamină, un medicament pe bază de arsen dovedit a funcționa împotriva sifilisului.**

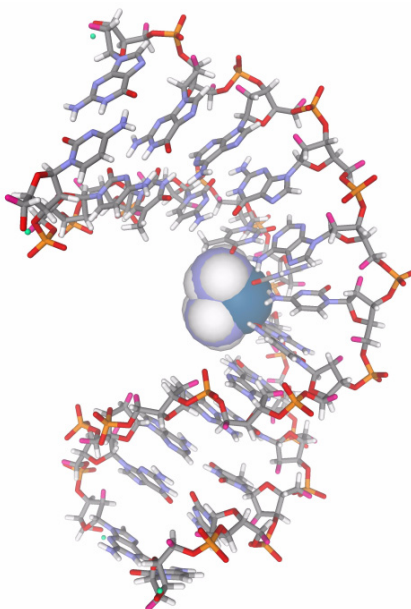
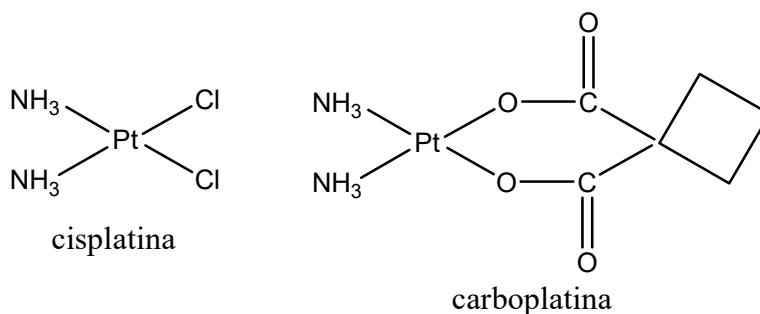
Un alt element cu importanță istorică este bismutul; folosit și azi pentru a trata probleme digestive, un astfel de preparat pe bază de bismut a fost cel folosit în primul studiu clinic desfășurat de doctori pentru a testa un medicament, acum cca 300 de ani.

Mercurul este unul dintre elementele cele mai cunoscute a avea efecte toxice, pe care și le manifestă în special în formă de combinații organometalice. Una dintre sursele cele mai periculoase de mercur din alimentație este peștele oceanic, întrucât mercurul se acumulează în carnea acestui animal. În condiții normale această acumulare ar fi neglijabilă, însă ea poate deveni extrem de periculoasă atunci când este vorba de pește venit în contact cu ape poluate industrial. Dezastrul de la Minamata, din Japonia, a rămas prin numărul mare al victimelor umane un moment de referință în ce privește acest mod de poluare. Pe de altă parte, alți compuși pe bază

de mercur au toxicitate mult mai redusă. Până nu de mult, timerosalul (Figura 15-5) era folosit, încă din anii 1920-1930, ca agent de conservare în vaccinuri; după anul 2000, această substanță a stat la baza unor controverse legate de posibila ei implicare în creșterea riscului de autism. Ca și arsenul, mercurul are ca principală țintă grupările tiolice (ambii parteneri fiind centri moi). Pe același principiu, un alt element care devine toxic în exces, seleniul, are și el afinitate mare pentru arsen sau mercur – atât de mare încât, legându-se de aceștia, se blochează reciproc și își diminuează astfel reciproc toxicitatea.



**Figura 15-5. Timerosalul, un derivat de mercur cu utilizare în medicină.**



**Figura 15-6. Structura cisplatinei și a unui derivat înrudit, carboplatina – și efectul pe care legarea acestora îl are asupra structurii ADN.**

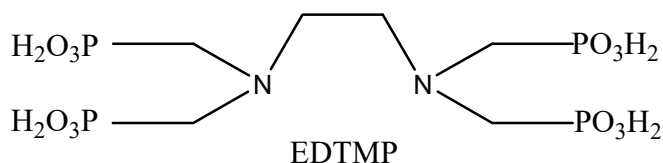
Unul dintre cele mai cunoscute metale cu aplicații în medicină este platina. Cisplatina (Figura 15-6) s-a dovedit a avea un potențial semnificativ de medicament anti-cancer (potențial descoperit întâmplător, la zeci de ani de la data descoperirii propriu-zise a cisplatinei). Împreună



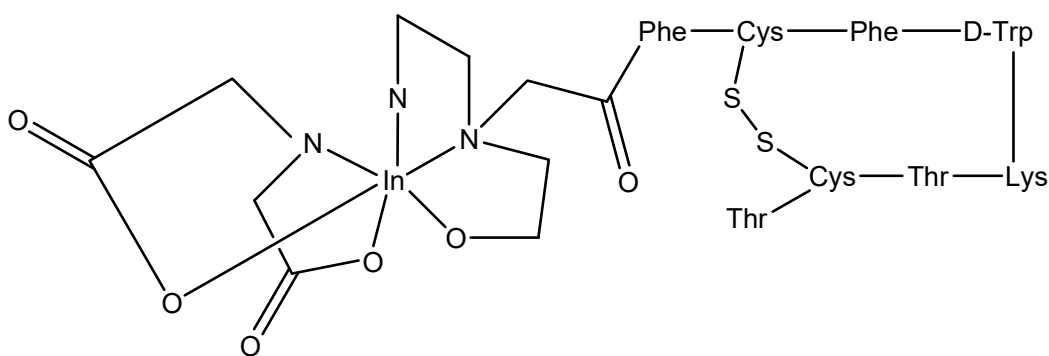
cu alți derivați similari, cisplatina a redus rata mortalității pentru unele forme de cancer de la 95% la doar 5%. Mecanismele de acțiune ale acestei clase de medicamente sunt, se pare, numeroase, însă probabil cel mai important este cel prin care platina pierde cei doi ioni de clorură, pe care îi înlocuiește cu atomi de azot din bazele azotate ale ADN; acest fenomen de legare induce o schimbare a structurii terțiare locale a ADN (Figura 15-6), astfel încât informația din acesta nu mai poate fi citită cu precizie de către enzimele specializate, ceea ce afectează nu numai capacitatea de funcționare a celulei, ci și cea de reproducere.

Unul din dezavantajele cisplatinei este lipsa ei de specificitate, care duce la afectarea întregului organism, nu doar a celulelor tumorale. Prin urmare, una din direcțiile actuale de cercetare se axează pe încercarea de a direcționa selectiv medicamentul către anume țesuturi sau organe. Un exemplu în acest sens este derivatul din Figura 85, care, datorită naturii ligandului, ajunge cu precădere la oase.

Un rol aparte îl joacă elementele radioactive. Unele dintre ele sunt folosite cu scop terapeutic (ca de exemplu cel ilustrat în Figura 15-7), profitându-se în fapt de toxicitatea lor, în măsura în care aceasta poate fi controlată. Altele pot fi folosite în scopuri diagnostice, cum este derivatul din Figura 15-8. Există desigur și metale non-radioactive cu utilitate diagnostică. Bariul (sub formă de sulfat) este bine-cunoscut pentru utilitatea sa în endoscopie, datorită capacității de a absorbi razele X. Gadoliniul sau europiul sunt folosite ca agenți de vizualizare în examinarea cu RMN, caracterul lor puternic paramagnetic permițând vizualizarea mai eficientă a zonelor din organism bogate în apă (ca de exemplu sistemul cardiovascular).

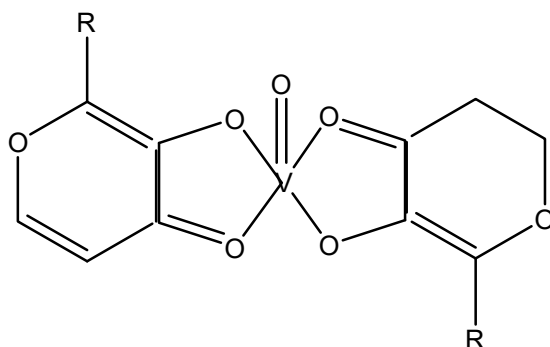


**Figura 15-7. EDTMP, un ligand folosit pentru  $^{153}\text{Sm}$  pentru un medicament radioactiv cu specificitate pentru oase.**



**Figura 15-8. Un derivat de  $^{111}\text{In}$ , al cărui grupare peptidică îl direcționează selectiv către țesuturile tumorale, pe care le marchează în acest fel radioactiv pentru a putea fi detectate mai ușor.**

Compusul de vanadiu din Figura 15-9 are proprietatea de a funcționa *in vivo* ca analog al insulinei, cu avantajul de a permite administrarea orală; motivele pentru care el este eficient sunt încă necunoscute, structura fiind complet diferită de cea pur organică, polipeptidică, a insulinei.



**Figura 15-9. Un analog funcțional al insulinei.**

Litiul este folosit de multă vreme în tratamente psihiatrice, fără a se fi înțeles multă vreme modurile de acțiune. Date recente confirmă ipoteza că ele au la bază similitudinea dintre litiu și cele două elemente alcaline, sodiul și potasiul, care au un rol central în transmiterea impulsurilor nervoase în creier și în neuroni în general după modelul descris în Capitolul 8 – dar și efecte ale litiului direct asupra unor enzime din metabolism mai degrabă decât asupra canalelor de sodiu sau potasiu.<sup>93–95</sup> Diverse alte metale au potențiale aplicații în medicină și pot fi întâlnite în suplimente alimentare disponibile comercial, deși este important de subliniat că încă nu există o bază științifică fermă pentru utilizarea lor în această formă. Exemple ar fi aluminiul, cromul sau siliciul. Capitolele 0 și 18 tratează și alte aspecte relevante medical ale metalelor.

## 16. Biosinteza centrilor metalici în proteine

Inserarea metalelor în metaloproteine se face prin 7 tipuri de mecanisme:<sup>96</sup>

- (1) Simpla atașare prin echilibru chimic. Aceasta este valabilă de obicei pentru centrii foarte simpli (în special la metalele relativ abundente în celulă), care nu includ liganzi speciali.
- (2) Livrarea metalului (sau cofactorului care conține metalul) la situs de către o proteină dădăcă specializată (chaperon). Astfel de mecanisme sunt cunoscute/studiate foarte bine în special pentru proteine pe bază de cupru. Este de reținut că în interiorul celulelor nivelul metalelor tranzitionale în formă este controlat foarte strict, din cauza reactivității foarte versatile a acestor metale, care altfel ar duce la reacții secundare necontrolabile. Spre exemplu, concentrația ionului liber de cupru (dar și a altora similari) în celule poate fi la nivelul de 1 atom per celulă sau mai puțin.
- (3) Modificarea post-translațională a aminoacizilor de la situsul activ, pentru a permite legarea metalului. Exemple de proteine unde se întâmplă astfel de modificări sunt factorii de coagulare (unde prin reacții de carboxilare a glutamatului cu ajutorul vitaminei K se transformă resturile de glutamat în  $\gamma$ -carboxiglutamat pentru a facilita legarea mai eficientă a calciului, un element esențial în cascada de coagulare a sângelui), rubisco și ureaza (unde prin atașarea unei molecule de CO<sub>2</sub> la un rest amino se creează un nou ligand pentru Mg respectiv Ni – o lizină carbamilată), nitril hidrataza (unde două cisteine ce vor coordina la Co/Fe sunt oxigenate la sulf generând acid sulfenic și respectiv sulfinic), citocrom *c* oxidaza (unde o histidină legat la cuprul din situsul activ este conectată la inelul fenolic al unei tirozine), fosvitina (foarte bogată în serine, care sunt apoi fosforilate) și altele.
- (4) Legarea concomitentă / în sinergie a metalului împreună cu un cofactor. Exemple includ legarea fierului împreună cu un anion carbonat la transferină, sau legarea magneziului împreună cu ATP la enzime precum kinazele sau fosforilazele.
- (5) Inserarea unui cofactor metalic pre-sintetizat. Exemple includ hemurile, clorofilele, cobalamina – care sunt sintetizate separat pornind de la aminoacizi simpli, cu metalul inserat abia la finalul sintezei, după care cofactorul matur este atașat la proteină.
- (6) Inserare cuplată cu reacție redox a metalului. În general fierul și cuprul sunt livrate către situsul activ în formă redusă (mai labilă cinetic, deci mai ușor de transferat către proteina țintă), care este apoi oxidată adesea imediat după inserare în situsul activ, pentru a asigura fixarea mai eficientă a metalului acolo. Fixarea fierului în feritină (descrisă în Capitolul 11) este un exemplu tipic în acest sens.
- (7) Fixarea metalului cu ajutorul unor proteine chaperon pentru asamblarea apoproteinei, nu doar a situsului metalic. Spre exemplu asamblarea ureazei necesită 7 proteine diferite, notate cu UreA, UreB... UreG, dintre care 3 constituie heterotrimerul propriu-zis din care este formată ureaza (UreABC), 3 facilitează asamblarea acestui trimer (UreDFG) și a șaptea livrează nichelul (UreE).

## 17. Biominerale

Se folosește termenul de biomineral pentru complexii complet anorganici (minerale) sintetizați de către organisme vii – de obicei pentru a profita de proprietățile mineralului respectiv. Exemple de motive pentru folosirea de biominerale sunt rezistența mecanică (schelete interne sau externe, componente de apărare), senzori magnetici (pe bază de fier), senzori de gravitație, detoxificare, sau altele.

Carbonatul de calciu în diverse forme este folosit în exoschelete (corali), coji de ouă, carapace de scoici, senzori de gravitație. Fosfatul de calciu (în special sub formă de hidroxiapatită) este folosit în oase și dinți. Oxalatul de calciu este folosit ca rezervă de calciu în plante, sau în mecanisme de apărare ale acestora. Sulfatii de calciu, bariu sau stronțiu sunt folosiți în exoschelete și în senzori de gravitație. Silicații amorfi sunt folosiți în valvele microorganismelor din clasa diatomeelor și în mecanisme de apărare ale plantelor. Oxizii de fier sunt folosiți în feritine pentru depozitarea fierului în celulă, dar și, mai exotic, în dinții unor moluște sau în senzori de câmp magnetic.

Unele organisme fie au fie pot dezvolta capacitatea de a biomineraliza ioni metalici pentru a se apăra de toxicitatea acestora – iar cercetătorii au dezvoltat metode pentru a profita de acest lucru pentru a transforma organismele respective în agenți de detoxifiere (se vorbește atunci de „bioremediere” a mediului) sau, mai spectaculos financiar, în instrumente utile pentru minerit. Elemente precum cuprul, aurul, vanadiul sau uraniul se încadrează în această situație.

## 18. Dezechilibre ale nivelului metalelor în organism: implicații medicale

O mică perturbare a concentrației metalelor din organism determină patologii mai mult sau mai puțin grave. Mijlocul cel mai utilizat de medici în diagnosticarea și tratarea diverselor afecțiuni este reprezentat de analizele de laborator. Capitolul de față oferă o scurtă prezentare cu scopul evidențierii importanței metalelor și cunoștințelor actuale despre diagnosticarea și tratarea corectă a afecțiunilor provocate de pierderea homeostaziei lor. Un tratament mai detaliat (pe baza căruia este alcătuit materialul de aici) este oferit în referința <sup>97</sup>.

Corpul omenesc necesită în jur de 20 de elemente esențiale pentru a funcționa, iar dintre acestea, 10 sunt metale. Un număr de alte metale sunt importante medical din cauza toxicității lor.

### 18.1. Dezechilibre ale fierului

În corpul uman, fierul se găsește incorporat în proteine fiind regăsit în hem, în clusteri cu sulf sau în alte grupări funcționale. Acolo, fierul are rol în funcții biologice precum transportul oxigenului (hemoglobina), metabolismul oxigenului (catalaze, peroxidaze), respirație celulară și transportul de electroni (citocrom). Când nu este legat la proteine, Fe poate fi dăunător, catalizând generarea radicalilor liberi (în special prin așa-numita reacție Fenton, unde clivează legătura oxigen-oxigen din oxigenul molecular sau din apa oxigenată), radicali care degradează membranele celulare, proteinele și ADN-ul. De aceea doar o mică cantitate de fier se află liberă în organism, iar în rest el circulă prin plasmă legat de transferină și este depozitat în celule sub formă de feritină și forma ei parțial degradată, hemosiderina. Acestea se găsesc preponderent în celulele ficatului, splinei și măduvei osoase.

**Tabelul 18-1. Repartizare fierului în bărbați și femei.**

Cantitate fier	Bărbați (mg)	Femei (mg)	Procentual
Total	3000–4000	2000–3000	100
Hemoglobină	2400	1700	65
Stocare intracelulară (feritină și hemosiderină)	1000	500	30
Mioglobină	150	120	3.5
Fier legat de transferină	4	3	0.1

Când concentrația fierului este prea mare, pacientul suferă de hemocromatoză, iar când concentrația este insuficientă se poate vorbi de anemie. Metodele analitice de măsurare a fierului includ măsurarea concentrației fierului din ser (sideremia), capacitatea totală de legare a fierului, coeficientul de saturare al transferinei și concentrația feritinei din ser.<sup>6</sup>

### 18.1.1. Excesul de fier

Hemocromatoza ereditară este cea mai comună patologie dată de excesul de fier. Este caracterizată de absorbția excesivă a fierului datorită deficitului de hepcidină, hormonul secretat de ficat care inhibă absorbția fierului din mucoasa celulelor intestinale. Fierul este depozitat în funcție de absorbția intestinală, neexistând în organism mecanisme fiziologice pentru excreția fierului în exces. Hemocromatoza ereditară se datorează unei mutații la nivelul genei HFE unde se substituie cisteina cu un rest de tirozină în poziția 282. Excesul de fier, dacă nu este diagnosticat la timp (a se vedea și Figura 18-1), cauzează hepatomegalie, ciroză, diabet, cardiomiopatie, hipogonadism și pigmentarea pielii.

Analiza cea mai utilizată în scop diagnostic este cea a feritinei din ser. La valori peste 300 ng/mL se suspectează un exces de fier, dar nivelul poate fi influențat și de citokine, hormoni sau de stresul oxidativ. Coeficientul de saturație al transferinei se calculează împărțind valoarea sideremiei la capacitatea totală de legare a fierului. El sugerează un exces de fier dacă este mai mare de 50%. Pentru diagnoză se mai poate folosi RMN-ul sau biopsia ficatului. Analiza concentrației hepcidinei din ser este folositoare, dar sunt puține instituțiile care o oferă. Un test genetic este, de asemenea, necesar în diagnosticul hemocromatozei ereditare, dar implică timp și este costisitor.

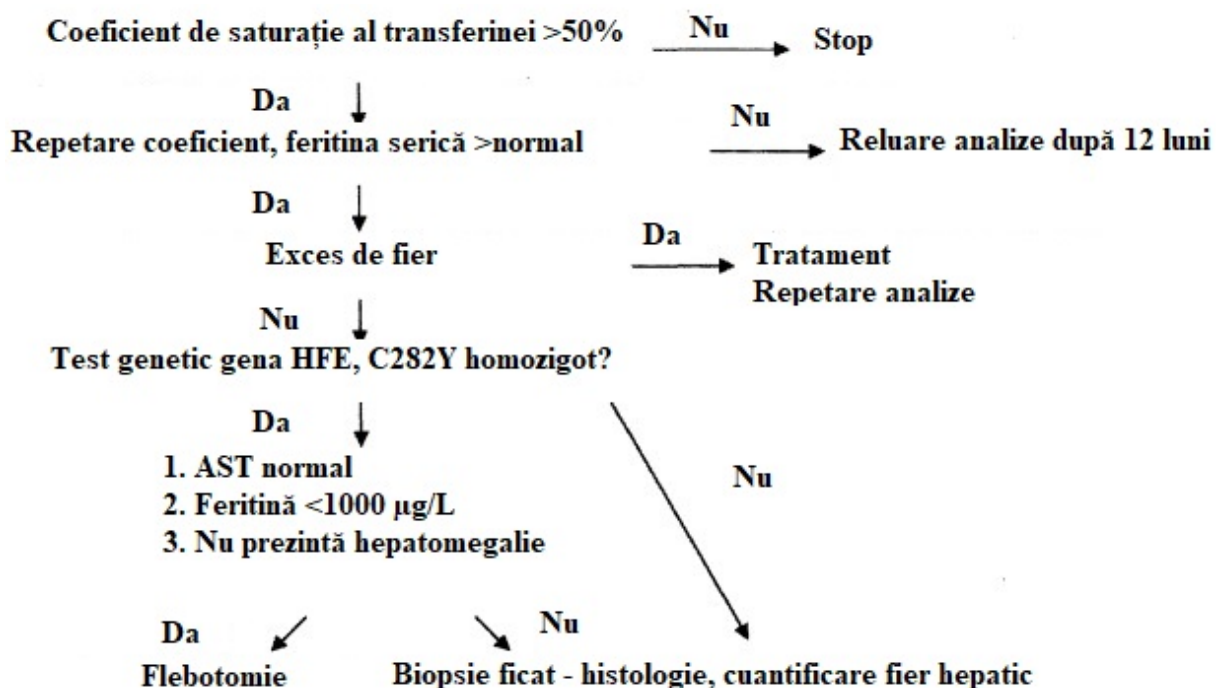


Figura 18-1. Etapele diagnosticării hemocromatozei.

Tratamentul standard este flebotomia. Pe sesiune se recoltează o cantitate de 7 mL/kg corp (maximum 400-500 mL de sânge). Sesiunile au loc săptămânal sau de două ori pe săptămână, iar înaintea fiecărei sesiuni se monitorizează nivelul de hemoglobină pentru a evita anemia. Se estimează o recoltare de 0,5 mg fier/mL sânge ceea ce înseamnă o scădere a feritinei de 30 µg/L/sesiune. O metodă mai rapidă de scăderea fierului este afereza, adică recoltarea automată de eritrocite, unicul dezavantaj fiind prețul mai ridicat. Se poate utiliza și tratamentul farmacologic care utilizează chelatori de fier precum desferioxamina, deferiprona și deferasiroxul. Acestea

sunt molecule mari care formează complecși cu fierul. Din cauza efectelor adverse, în prezent se explorează în continuare și alte variante de compuși cu efect chelator.

### 18.1.2. Deficitul de fier

Simptomele anemiei sunt vagi și pot fi cauzate de diverse patologii. Ea prezintă diverse etape: prima este o scădere a nivelului fierului manifestată prin scăderea feritinei serice, următoarea etapă este deficitul de fier caracterizat și de nivelul de fier seric, iar în final se instalează anemia, are loc o scădere a concentrației hemoglobinei, hematocritului, volumului eritocitar mediu, feritinei serice, sideremiei și al coeficientului de saturație al transferinei.

Testele de laborator necesare pentru efectuarea diagnosticului sunt următoarele: sideremia, adică fierul legat de transferină, capacitatea totală de legare a fierului, o măsurătoare a nivelului transferinei din circulație și concentrația feritinei din ser. Când valoarea sideremiei este mai mică de 50  $\mu\text{g/dL}$ , se suspectează anemia. Sideremia și capacitatea totală de legare a fierului sunt folosite pentru a calcula procentual coeficientul de saturație al transferinei. Valoarea sub 18% sugerează o lipsă de fier necesar în sinteza hemoglobinei, sub 15% este caracteristică anemiei, dar de una singură nu reprezintă un diagnostic. Apoferrina are un nivel instabil care crește în inflamații și leziuni ale hepatocitelor; de aceea, interpretarea acestei analize este problematică, dar dacă are o valoare scăzută, sub 13  $\text{ng/mL}$  și valoarea transferinei este mai mică de 200  $\text{mg/dL}$ , atunci se confirmă diagnosticul de anemie. O analiză de laborator utilizată rar, dar care poate diferenția anemia de o boală inflamatorie este receptorul solubil de transferină.

După confirmarea diagnosticului, există mai multe opțiuni pentru tratamentul anemiei. Cea mai accesibilă și ieftină este terapia orală cu suplimente de fier. Dezavantajul acestui tratament este absorbția scăzută de fier care poate fi redusă și mai mult de alte medicamente, ducând la un tratament pe perioadă lungă. Când suplimentarea orală cu fier nu poate avea loc, de exemplu în cazul unei inflamații sau în cazul unei nevoi urgente de fier, se utilizează administrarea intravenoasă. Cu toate că este mult mai eficientă, nu este utilizată pe deplin datorită temerilor legate de efectele adverse grave printre care șocul anafilactic, infecții sau exces de fier. O tehnică mai nouă este fierul dializat.

## 18.2. Dezechilibre ale cuprului

Cuprul este un oligoelement implicat într-o serie de procese fiziologice și biochimice, fiind un cofactor a numeroase metaloenzime care catalizează procese enzimatice precum respirația celulară, biosinteza neurotransmițătorilor și hormonilor peptidici, protecția împotriva radicalilor liberi. Cuprul are un rol esențial și în homeostazia fierului, indirect afectând hematopoieza și coagularea sângelui.

În Figura 18-2 se observă că absorbția cuprului are loc la nivel intestinal, 75% ajunge la ficat, iar restul merge în sistemul circulator legat de albumină. Din ficat 20% din cupru este excretat în tractul gastrointestinal și 80% este trimis la ceruloplasmină. S-a demonstrat o corelare între cantitatea excretată de Cu prin materiile fecale și cea ingerată prin dietă, deci se poate preciza că majoritatea cuprului de origine endogenă secretat în lumenul gastrointestinal este reabsorbit, astfel încât acest lumen are un rol major în homeostazia cuprului.

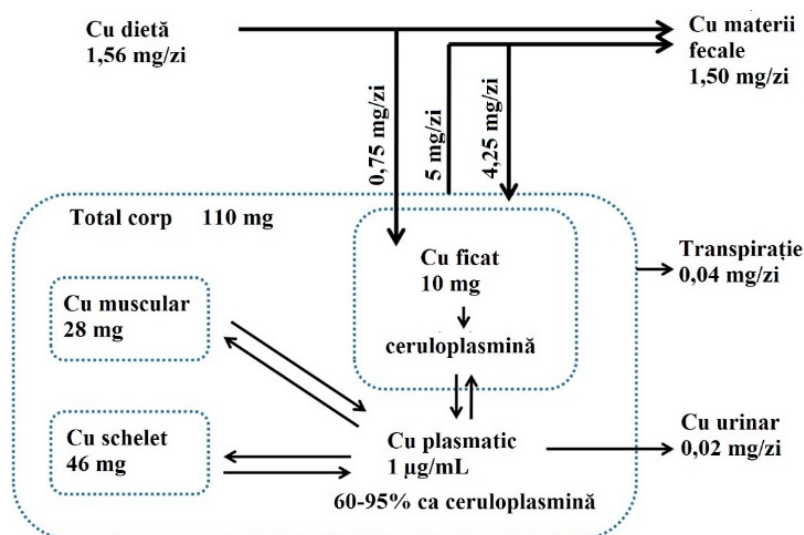


Figura 18-2. Fluxul cuprului în corpul uman.

### 18.2.1. Excesul de cupru

Boala Wilson este o boală genetică manifestată prin stocarea excesivă a cuprului. Gena care o cauzează este ATP7B care codifică o ATP-ază transportatoare de cupru. Această boală se manifestă în special la copii și adulți, la copii primele semne sunt afecțiunile hepatice, iar la adulți se manifestă prin tulburări neurologice precum distonia, ataxia și parkinsonismul.

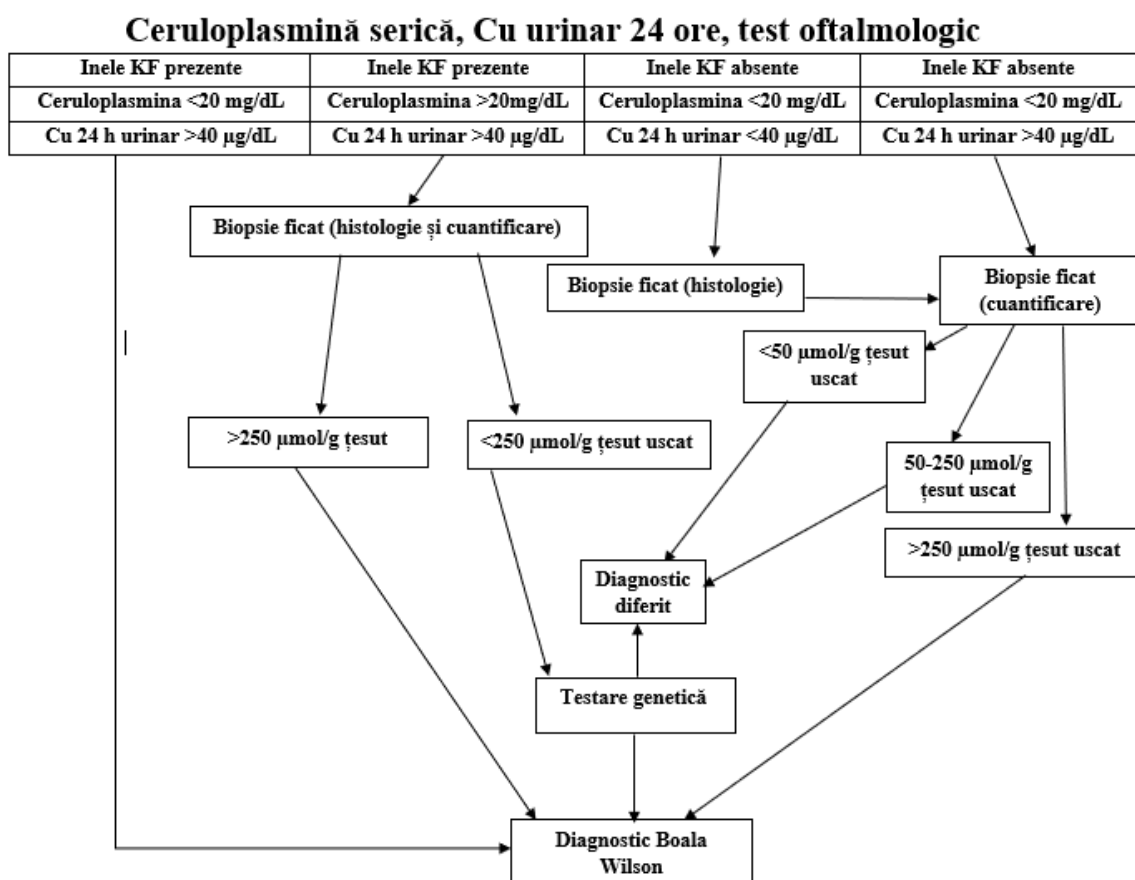


Figura 18-3. Etapele diagnosticării bolii Wilson.



În vederea diagnosticării acestei boli (a se vedea și **Error! Reference source not found.**), analizele de bază sunt concentrația de cupru din plasmă, concentrația ceruloplasminei și concentrația cuprului în urină. Semnele bolii Wilson sunt date de valori mici ale primelor două și o concentrație ridicată de cupru în urină. Uneori aceste valori pot fi interpretate fals, nivelul de ceruloplasmină fiind influențat și de estrogen, inflamații, infecții. Nivelul crescut de cupru în urină se mai întâlnește și în alte boli ale ficatului precum hepatita autoimună, hepatită activă cronică sau insuficiență hepatică. Fiecare moleculă de ceruloplasmină conține șase atomi de cupru, această proteină fiind cel mai important transportator de cupru din organism. Un semn tipic bolii Wilson este un nivelul acesteia sub 200 mg/L asociată cu inelele Kayser-Fleischer (inele de culoare gălbuie-maronie care înconjoară irisul). Dacă analizele nu sunt concludente, se poate recurge la biopsia ficatului.

Tratamentul medical constă în administrarea medicamentelor chelatoare de cupru și a celor care împiedică absorbția cuprului la nivel gastrointestinal. Medicamentele chelatoare disponibile în prezent sunt dimercaptrol, penicilamina, acidul dimercapropropansulfonic și trietilentetraamina. Zincul administrat sub formă de săruri scade absorbția de cupru intestinală. Aceste tratamente prezintă efecte adverse la unii pacienți, în special înrăutățirea problemelor neurologice. Pentru a evita aceste efecte se monitorizează în permanență pacienții în vederea stabilirii tratamentului adecvat.

### 18.2.2. Deficitul de cupru

Principală cauză a deficitului de cupru la bebeluși este depozitarea insuficientă a cuprului. La adulți, este alimentația deficitară în cupru, absorbția problematică și boli genetice, dar lipsa de cupru este întâlnită rar. Deficitul de cupru afectează activitatea enzimelor dependente de cupru; un exemplu este tirozinaza, enzimă implicată în producția de melanină. Hipopigmentarea este prezentă la copiii cu sindromul Menkes, o boală genetică care afectează transportul cuprului prin membranele celulare. Prin scăderea activității feroxidazelor dependente de cupru, deficitul determină și anemie. O altă manifestare este ataxia. Pe lângă efectele asupra enzimelor, deficitul de cupru prezintă efecte și asupra proteinelor transportatoare de cupru, cu rol important în homeostazie. Aceste complicații apar în special drept complicații după o operație de bypass; de aceea, monitorizarea nivelului de cupru prin analize după astfel de operații este importantă.

Cea mai utilizată analiză pentru a determina deficitul de cupru este concentrația cuprului din plasmă, dar concentrația este foarte scăzută doar în cazurile severe de anemie. O analiză utilă în acest scop este cea a ceruloplasminei, însă nivelul ei este afectat în plus și de bolile inflamatorii. Testele care confirmă sunt analiza cuprului din urină în ultimele 24 de ore, care trebuie să aibă o valoare mai mică de 10  $\mu\text{g}/\text{zi}$ , respectiv analiza concentrației superoxid dismutazei – care însă prezintă valori scăzute doar după câteva săptămâni. Markerii biologici specifici sindromului Menkes sunt cuprul seric cu valori mai mici de 11  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , ceruloplasmina serică cu valori mai mici de 200 mg/L și examinarea microscopică a firelor de păr.<sup>23</sup>

Tratamentul utilizat poate fi oral sau parenteral, în funcție de severitatea deficitului. Cuprul se administrează sub formă de gluconat, sulfat sau clorură de cupru, forma organică fiind mai solubilă decât sărurile anorganice. În cazurile severe se administrează intravenos timp de 6 zile urmat de tratamentul oral până la normalizarea nivelului. Efectele adverse sunt date în special de administrarea intravenoasă și includ toxicitate a ficatului, hemoliză și necroză hepatică care poate fi fatală.

### 18.3. Dezechilibre ale calciului

Calciul este printre cele mai răspândite elemente din organism. El reprezintă aproximativ 2% din greutatea corporală. Peste 99% din calciul este localizat în schelet, sub formă de hidroxiapatită. Pe lângă rolul în mineralizarea oaselor și dinților, mai are rol în reglarea funcțiilor celulare. Oasele sunt formate dintr-o matrice proteică care se mineralizează cu ajutorul calciului, magneziului, fosforului și vitaminei D. Calciul sub formă de ion liber în soluție (nu fixat în proteine sau oase), numit impropriu și „ionic” (denumire improprie deoarece în sistemele vii Ca nu apare decât ca ion, nu ca element neutru metalic) este esențial în realizarea funcțiilor tuturor celulelor. Calciul ionic poate avea rol structural, menținând structurile celulare, dar și rol regulator, deoarece nivelul calciului plasmatic reglează activitatea enzimatică și nivelul intracelular de calciu care controlează funcții celulare precum diviziune, secreție, metabolism celular. Calciul are rol și în contracția musculară; când concentrația de calciu crește, mușchiul se contractă, iar când scade acesta se relaxează. Acest mecanism are loc prin atașarea calciului la troponină – o proteină înrudită cu calmodulina.

#### 18.3.1. Excesul de calciu

Hipercalcemia poate fi mediată de hormonul paratiroidian, atunci când vorbim de hiperparatiroidism. Hormonul tiroidian este principalul regulator al homeostaziei calciului; atunci când el este secretat în exces, afectează concentrația calciului seric și unele organe precum oase, rinichi și intestin. O formă genetică este hipercalcemia hipocalciurică, unde calciul, în concentrație mare, este reabsorbit continuu la nivelul rinichilor și are drept consecință hipocalciuria. Atunci când cauza hipercalcemiei este producerea de calcitriol sau citokine, este vorba despre hipercalcemie nemediată de hormonul paratiroidian. Aceasta are loc în cazul unei tumori sau al efectului diuretic al tiazidelor care cresc reabsorbția renală a calciului.

Diagnosticul de hipercalcemie (a se vedea și Figura 18-4) are loc după analizarea concentrației calciului seric. Simptomele includ durere musculară, stare depresivă, colici renale și abdominale. Calciul seric este legat de proteine; de aceea, se utilizează următoarea formulă pentru a ajusta concentrația lui la cea a albuminei.

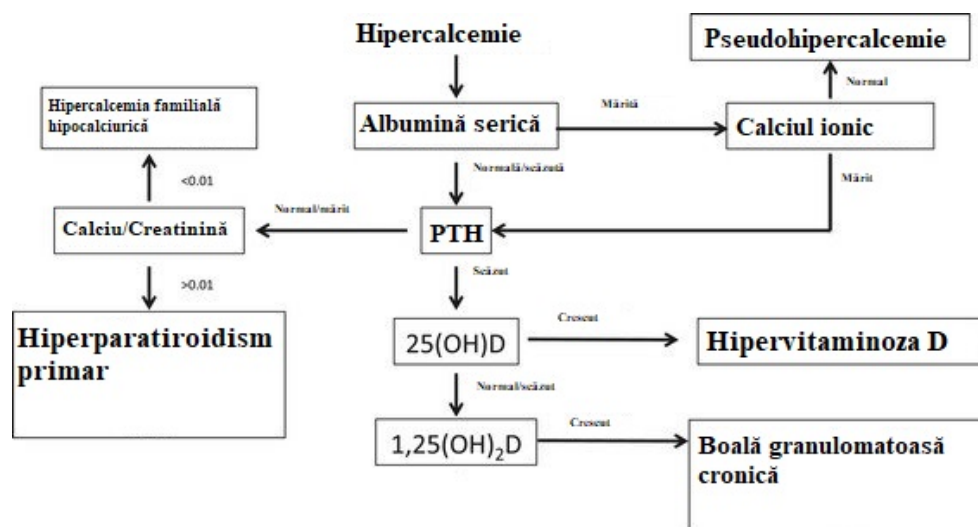


Figura 18-4. Schema diagnosticului patologiilor hipercalcemiei.

Pentru a distinge între paratiroidism și hipercalcemia hipocalciurică se fac analize de biochimie urinară cu scopul determinării raportului calciu/creatinină. Acesta se calculează după analiza simultană a concentrației calciului din urină și plasmă și concentrația creatininei. Pentru a exclude o toxicitate a vitaminei D sau un deficit, care pot influența concentrația de calciu, se face testul de laborator care măsoară 25-OH-vitamina D.

Tratamentul hipercalcemiei se alege în funcție de severitate. Pacienții cu concentrația calciului seric mai mare de 12,5 mg/dL pot fi asimptomatici, dar au un risc mărit pentru complicații precum calcifierea țesutului osos. Când concentrația depășește 14 mg/dL, pot avea loc leziuni renale acute, hipotensiune, somnolență, anomalii electrocardiografice și stop cardiac. Prima fază a tratamentului constă în administrarea intravenoasă de soluții saline izotonice; în cazul în care pacientul urma un tratament cu diuretice tiazide, calcitriol, litiu, sau vitamina D, acestea se vor întrerupe. Un tratament cu puține efecte adverse (greață, vomă) este calcitonina sintetică de somon care este utilizată pentru a controla rapid hipercalcemia. Tratamentul cu bifosfonați, agenți antiresorbtivi, analogi sintetici de pirofosfat, cu rol inhibitor asupra activității osteoclastelor. Glucocorticoizii sunt folosiți pentru scăderea nivelului calciului prin scăderea absorbției intestinale datorate sintezei scăzute de 1,25-dihidroxi-vitamina D și creșterea excreției urinare a calciului. Alte terapii includ calcimimetice (activează receptorii de calciu), denosumab (anticorp monoclonal care previne dezvoltarea osteoclastelor), sau hemodializa, o măsură temporară, care scade, dar nu tratează hipercalcemia.

### 18.3.2. Deficitul de calciu

Simptomele hipocalcemiei sunt tulburări neuromusculare, amorțeală, furnicături în mâini și picioare, spasme musculare, iar mai severe sunt spasmele laringiene și convulsii. Deficitul de calciu este asociat hipoparatiroidismului care poate să apară imediat după operația la tiroidă sau paratiroidă sau poate fi cauza unui sindrom autoimun sau cauză genetică. Hipocalcemia are loc și în cazul unei deficiențe de vitamina D, cu rol în absorbția intestinală de calciu.

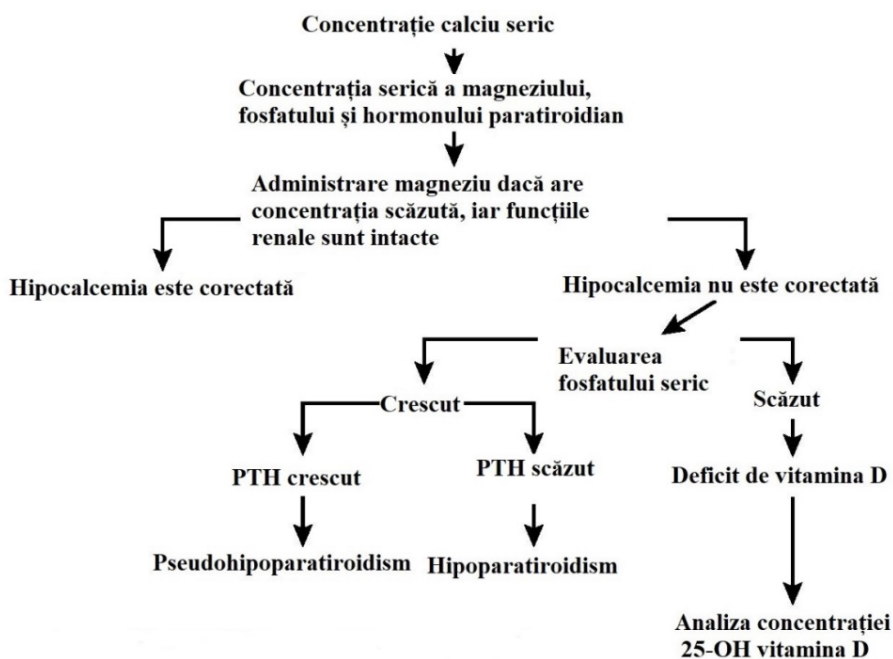


Figura 18-5. Schema diagnosticării pacienților cu hipocalcemie.

Utilă în diagnoză (a se vedea și Figura 18-5) este concentrația calciului seric care trebuie interpretată în relație cu albumina serică fiindcă doar calciul ionic este important din punct de vedere biologic. Analiza concentrației serice a hormonul paratiroidian este utilă în cazul în care nu este cunoscută cauza hipocalcemiei, urmată de analiza concentrației serice a magneziului, ureei, creatininei și 25-OH-vitamina D.

În cazul în care hipocalcemia este asociată cu hipomagneziemia, se administrează magneziu oral sau parental; hipocalcemia asociată cu deficit de vitamina D se tratează cu suplimente de vitamina D și calciu. În cazul hipocalcemiei acute se administrează calciu intravenos sub formă de gluconat sau clorură de calciu. În timpul tratamentului pacienților trebuie monitorizată periodic concentrația de calciu pentru a evita hipercalcemia. Pacienților care urmează să fie supuși unei operații chirurgicale la nivelul tiroidei, li se administrează suplimente de calciu și vitamina D pentru a diminua riscul de hipocalcemie. Tratamentele pe termen lung sunt reprezentate de comprimate orale de citrat sau carbonat de calciu și sunt destinate pacienților cu hipotiroidism cronic. Pe lângă acestea se mai pot adăuga tratamentul tiazidele diuretice și colecalciferolul.

## 18.4. Dezechilibre ale magneziului

Magneziul este unul dintre cei mai abundenți cationi atât în procariote, cât și în eucariote. În corpul uman, cea mai mare parte se află în schelet și intracelular; doar o mică parte se află în sânge (a se vedea și Figura 18-6). Importanța magneziului este dată de participarea acestuia în calitate de cofactor în peste 300 de reacții enzimactice, reglând astfel multe procese celulare, în special în metabolismul carbohidraților și a lipidelor. Magneziul are și rol stabilizator pentru proteine, acizi nucleici, membrane biologice; el reglează canalele ionice și transportul celular și are rol în funcționarea oaselor reglând absorbția de calciu.

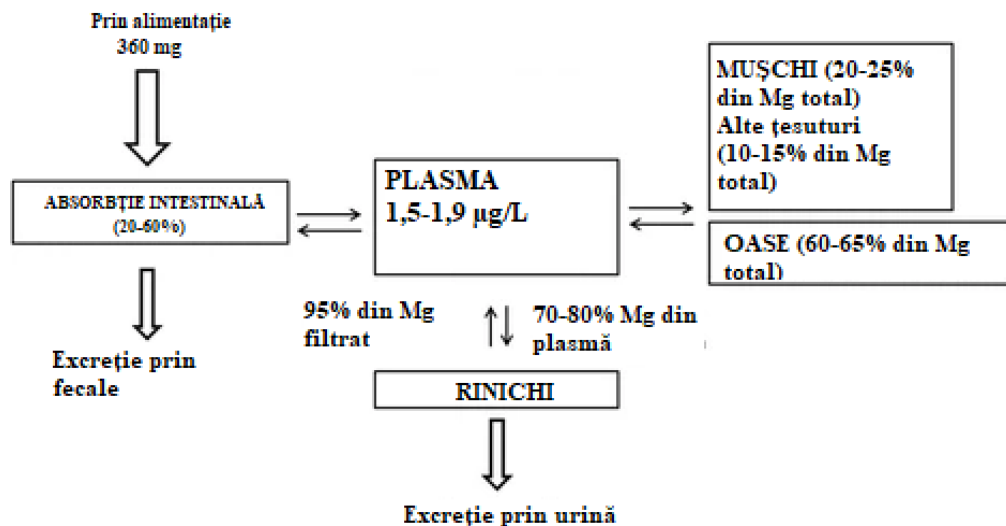


Figura 18-6. Homeostazia magneziului.

### 18.4.1. Excesul de magneziu

Excesul de magneziu este un dezechilibru electrolitic întâlnit rar. Au fost reportate cazuri de hipermagnezie în pacienți cu funcții renale foarte scăzute și cărora li s-au administrat

doze mari de antiacid și laxative cu conținut de magneziu. Excesul de magneziu apare și după administrarea parenterală de magneziu în doză prea mare și are ca simptome stare de greață, dureri de cap și înroșirea feței. În cazurile grave simptomele sunt în special neurologice: confuzie, absența reflexelor tendoanelor, perturbarea mersului, alte simptome precum voma sau starea de greață sunt de asemenea prezente. Există o controversă care susține că excesul moderat de magneziu per ansamblu nu este dăunător. Aceste speculații se bazează pe proprietățile anti-inflamatorii, antioxidante și antiapoptotice, care scad secreția de hormon paratiroidian. Magneziul acționează prin inhibarea formării de hidroxiapatită, împotriva calcifierii vasculare; de asemenea, se leagă de fosfați și îmbunătățește funcția endotelială. Cu toate acestea, încă nu există un studiu care să evedențieze beneficiul hiperemagnezemiei asupra întregii populații.

Pacienții cu funcție renală normală și o hiperemagnezemie moderată, asimptomatică, nu necesită tratament, cu excepția eliminării surselor exogene de magneziu. În cazurile severe este nevoie de un tratament imediat sub supravegherea atentă a electrocardiografe, a presiunii sanguine și a funcției neuromusculare. Tratamentul constă în gluconat de calciu sau clorură de calciu, administrate intravenos urmat de soluții saline intravenoase. Cazurile critice necesită hemodializă, când funcția rinichilor este afectată, însă este posibilă eliminarea excesivă a calciului provocând hipocalcemie. Utilizarea diureticelor asociată cu soluții saline este necesară pentru a evita alte dezechilibre electrolitice.

#### 18.4.2. Deficitul de magneziu

Cauzele deficitului de magneziu sunt datorate unei alimentații sărace în magneziu. Din totalitatea magneziului care se găsește în corp, doar 0,3% este în sânge; de aceea, analiza magneziului seric este un indicator slab în ceea ce privește conținutul de magneziu intracelular. Un indicator mai eficient și mai sensibil decât doar concentrația magneziului este coeficientul magneziu/calciu. În deficitul de magneziu cronic, nivelul magneziului din sânge este normal, cu toate că nivelul este foarte scăzut în țesuturi și oase. O analiză mai utilă decât magneziul seric este magneziul eritrocitar, deoarece în condițiile în care magneziul seric este scăzut, el va fi preluat din eritrocite. Diagnosticul este dificil de pus deoarece simptomele sunt nespecifice și sunt asemănătoare cu simptomele specifice unei diete scăzute în alți nutrienți.

Datorită cantității mari de magneziu filtrat și gradului variat de secreție, testele magneziului din urină nu sunt concludente. O metodă mai complicată se bazează pe concentrația intravenoasă de magneziu urmată de un test de urină a 24 de ore, pentru a pune în evidență procentajul de magneziu care este reținut de corp. Prin analiza spectroscopică de raze X cu dispersie de energie asupra celulelor sublinguale se poate realiza o corelație între magneziul intracelular din celulele sublinguale și respectiv a celor atriale preluate în timpul operațiilor pe cord deschis, dar aceasta nu este o metodă validată pentru a putea fi aplicată la nivel de întreg organism.

Tratamentul cel mai des întâlnit (a se vedea și Figura 18-7) este administrarea intravenoasă a perfuziilor cu soluții de magneziu, sau orală pentru pacienții care necesită suplimente pe termen lung. Sulfatul de magneziu sub formă de aerosol a fost folosit pe pacienții cu astm acut. Magneziul sub formele sale chelatoare de citrat sau lactat este mai bine tolerat, în timp ce formele precum sulfatul, clorura sau oxidul de magneziu prezintă ca efect advers diareea, care scade absorbția de magneziu. Calciul și magneziu se află în competiția pentru absorbție, astfel încât dietă bogată în calciu poate împiedica absorbția magneziului.

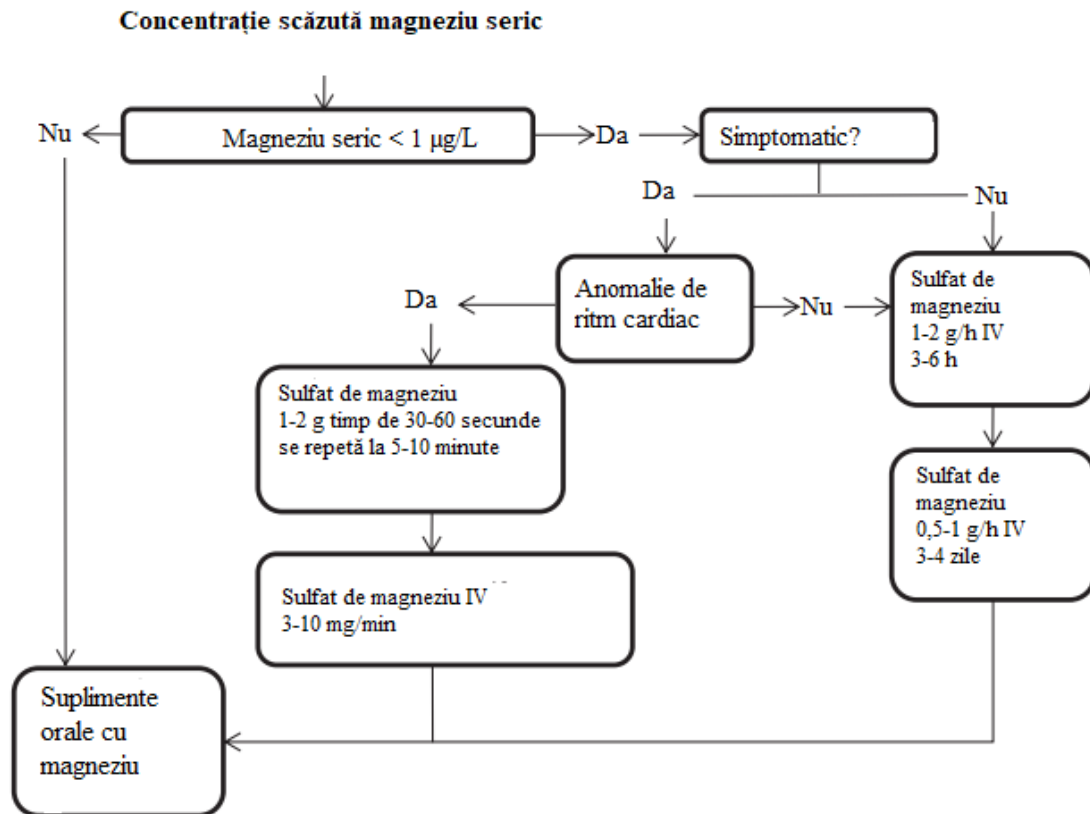


Figura 18-7. Schema de tratament a deficitului de magneziu.

## 18.5. Dezechilibre ale sodiului

Sodiul este cationul cel mai abundent din mediul extracelular. El menține o distribuție normală de apă în organism și are rol important în menținerea presiunii osmotice. Potasiul este cel mai abundent cation din mediul intracelular. Concentrația mare intracelulară este menținută de pompa de sodiu potasiu adenozintrifosfataza care transportă ionul de potasiu în celulă împotriva gradientului de concentrație. Ambii cationi sunt filtrați și reabsorbiți în mare parte, la nivelul rinichilor.<sup>4</sup>

### 18.5.1. Excesul de sodiu

Hipernatremia, mai puțin comună decât hiponatremia, este definită ca o creștere a concentrației plasmatică a sodiului peste valoarea de 145 mM. Celulele își măresc volumul atunci când se află în soluții hipotonice și se contractă atunci când se află în soluții hipertotonice, datorită mișcării apei înăuntru și înafara celulei. În mediul extracelular, tonicitatea celulelor este influențată de sodiu și glucoză, iar în mediul intracelular de potasiu. Hipernatremia este rezultatul combinat al unui deficit electrolitic și apos, cu creșterea concentrației de sodiu. Ea poate fi datorată unor pierderi ale apei la nivelul rinichilor în boli precum diabetul insipid central și diabetul nefrogen insipid, sau atunci când pierderea apei nu este la nivelul rinichilor vorbim de adipsie: indivizii afectați nu prezintă sete, cu toate că se află în hipertonicitate. Testele de laborator sunt necesare în vederea stabilirii factorilor cauzatori. Osmolaritatea urinară este un test efectuat pentru a vedea dacă funcția renală de concentrare este intactă.

Investigațiile de laborator cuprind sodiul plasmatic, sodiul urinar, osmolaritatea plasmatică și osmolaritatea urinară. Hipernatremia, în funcție de volumul spațiului extracelular, este hipovolemică atunci când procentul de apă din organism este scăzut iar sodiul urinar și osmolaritatea urinară au valori crescute, izovolemică când procentul de apă din organism este scăzut iar osmolaritatea urinară are valori scăzute, respectiv hipervolemică când procentul de din organism este variabil iar sodiul urinar și osmolaritatea urinară cuprind valori crescute. Primul pas în alegerea tratamentului potrivit constă în determinarea deficitului de apă din organism prin următoarea formulă: Deficit apă = Apa totală din organism \* [(sodiul seric/140) – 1]. Această ecuație estimează cantitatea necesară de apă pentru a reduce concentrația serică la valoarea de 140 mM. Rata scăderii concentrației trebuie să țină cont de severitatea simptomelor neurologice și de gradul de hipertonicitate (acută sau cronică). În majoritatea cazurilor este recomandată o scădere a concentrației sodiului seric de 8-10 mM/zi deoarece o scădere mai rapidă poate cauza edem cerebral. Pacienții cu hipernatremie acută, în schimb, necesită o scădere de 1 mEq/L/h pentru primele 6-8 ore de tratament pentru a preveni deshidratarea celulară care duce la hemoragie intracerebrală și subarahnoidă. În hipernatremia hipovolemică se administrează soluții saline normale urmate de soluții saline hipotonice sau soluții de glucoză. În hipernatremia izovolemică se administrează oral apă sau soluții de glucoză intravenos, iar în cazul hipernatremiei hipervolemică se administrează soluții de glucoză intravenoase și furosemidă, un medicament diuretic. În timpul tratamentului este importantă monitorizarea nivelelor serice de sodiu, uree, creatinină și concentrațiile urinare ale sodiului și potasiului.

### 18.5.2. Deficitul de sodiu

Hiponatremia (a se vedea și Figura 18-8) este un dezechilibru des întâlnit; ea nu este o boală, ci mai degrabă un proces patofiziologic care indică pierderea homeostaziei apei. Cauzele principale ale hiponatremiei sunt folosirea necorespunzătoare a antidiureticelor, polidipsia, insuficiența corticosuprarenală, hipovolemia, insuficiență cardiacă și ciroza ficatului, ultimele două cuprinzând hiponatremia hipervolemică. Hiponatremia este nehipotonică, atunci când este cauzată de hiperglicemie, administrarea de manitol sau de pseudohiponatremie, un artefact al laboratorului care este datorat unor concentrații mari de colesterol, trigliceride sau proteine. Hiponatremia hipotonică este de tip hipovolemic, izovolemic și hipervolemic. Cea de tip hipervolemic se poate diagnostica ușor prin prezența edemelor și a ascitei.

După analiza sodiului seric se efectuează analiza osmolarității plasmatice, a ureei, glucozei, creatininei și potasiului seric, în funcție de osmolaritate se diferențiază ca hipotonic, izotonic și hipertonic. Dacă pacientul are hiponatremie hipotonică, se efectuează analiza osmolarității urinare. Analiza sodiului urinar este utilă pentru diferențierea hipovolemiei și izovolemiei.

În cazul hiponatremiei severe, tratamentul constă în administrarea intravenoasă de soluție salină până la o creștere a concentrației sodiului seric de 5 mEq/L; această creștere este suficientă pentru a reduce riscul hernierii creierului sau a ischemiei cerebrale. În hiponatremia cronică, riscul sindromului osmotic demielinizant este crescut, în acest caz se administrează parental desmopresină sau intravenos o soluție apoasă de 5% dextroză. Atunci când simptomele hiponatremiei sunt moderate sau absente, strategia terapeutică diferă între pacienții cu o valoare mică de lichid extracelular; în acest caz se administrează o soluție salină izotonică, sau cu valoarea normală, crescută de lichid extracelular, în acest caz se utilizează oral uree.

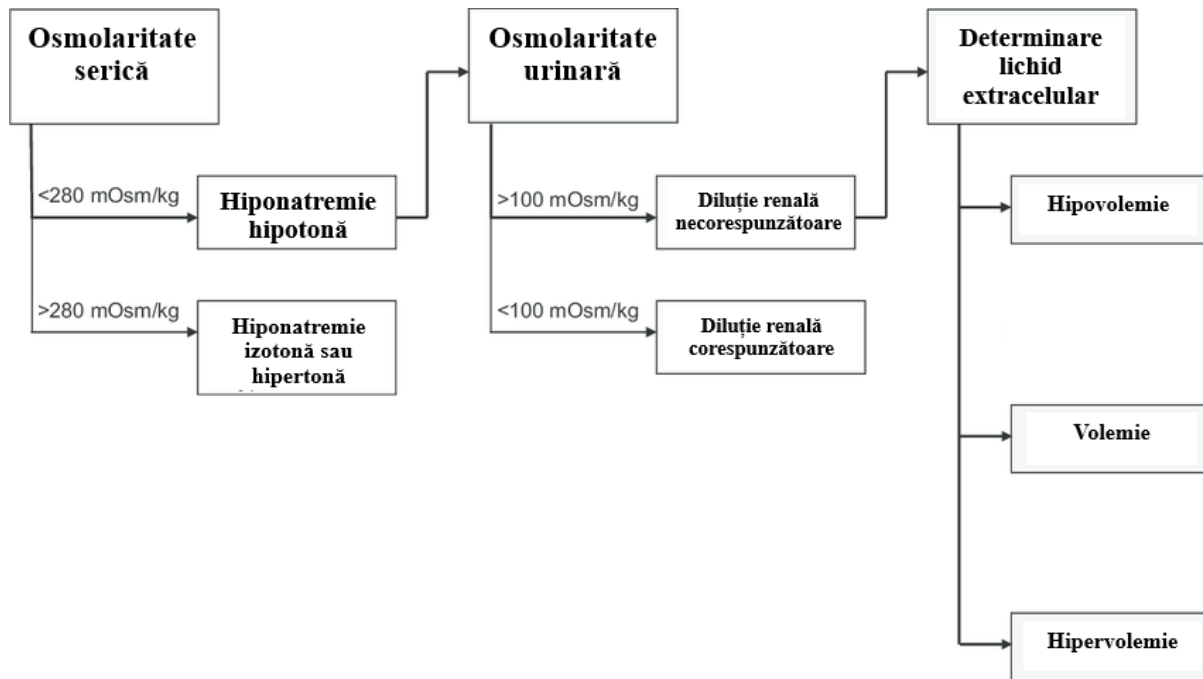


Figura 18-8. Schema diagnosticului hiponatremiei.

## 18.6. Dezechilibre ale potasiului

### 18.6.1. Excesul de potasiu

Hiperkaliemia este un dezechilibru electrolitic întâlnit în special în boli precum insuficiența cronică renală, diabet, insuficiență cardiacă sau în tratamentele cu inhibitori ai sistemului renină-angiotensină-aldosteron sau cu medicație antiinflamatorie nonsteroidală. Hiperkaliemia are loc atunci când se pierde homeostazia potasiului din cauza unui deficit de insulină, a creșterii biosintezei aldosteronului și a hiperglicemiei (a se vedea și Figura 18-9). Acestea afectează distribuția potasiului. Insuficiența renală și imposibilitatea augmentării secreției tubulară distală a potasiului, sunt responsabile pentru menținerea excesului de potasiu.

Hiperkaliemia are loc când crește concentrația plasmatică a potasiului și are efecte cardiace, metabolice și neuromusculare. În hiperkaliemie scade gradientul de potasiu transmembranar, membrana celulară se depolarizează și scade durata potențialului de acțiune. Aceste schimbări pot fi puse în evidență printr-o electrocardiogramă. Aceasta este dependentă și de nivelul seric al catecolaminelor, insulinei, calciului, sodiului și osmolaritatea serică, acesta fiind motivul pentru care nu este un test concludent în diagnoză. Efectul neuromuscular sunt absența reflexelor tendoanelor, iar cel metabolic este hipercloremia. Repetarea analizelor potasiului seric este benefică pentru a exclude pseudohiperkaliemia, care este comună și este cauzată de migrarea potasiului în afara celulei în timpul recoltării probei. Alte analize de sânge includ ureea și creatinina serică, creatinina urinară și electroliții din urină. După aceste analize urmează măsurarea glucozei serice pentru evaluarea hiperglicemiei și a aldosteronului seric și reninei plasmatice pentru investigarea funcțiilor rinichilor și funcțiilor glandelor suprarenale.

Tratamentul hiperkaliemiei severe constă în administrarea sărurilor de calciu (clorură de calciu sau gluconat de calciu) pentru stabilizarea membranei celulare și prevenirea aritmiilor ventriculare. Gluconatul de calciu este utilizat mai des datorită toxicității tisulare mai scăzute.



În continuare se administrează intravenos insulină și glucoză. Bicarbonatul de sodiu se administrează doar pacienților cu acidoză metabolică. Pe lângă acestea se mai utilizează agenți antihiperkaliemici precum ciclosilicat de zirconiu și diuretice. Dializa trebuie luată în considerare la pacienții cu disfuncții renale care persistă și care nu răspund la tratament. Înainte de utilizarea ciclosilicatului de zirconiu, ca medicament ligand pentru potasiu se folosea polistiren sulfonatul de sodiu, dar care avea o toleranță mai mică. Ciclosilicatul de zirconiu este un cation selectiv care leagă potasiu în locul hidrogenului și sodiului, având ca efecte adverse doar hipokaliemia și edemul. Acest medicament se folosește pentru tratamentul hiperkaliemiei cronice.

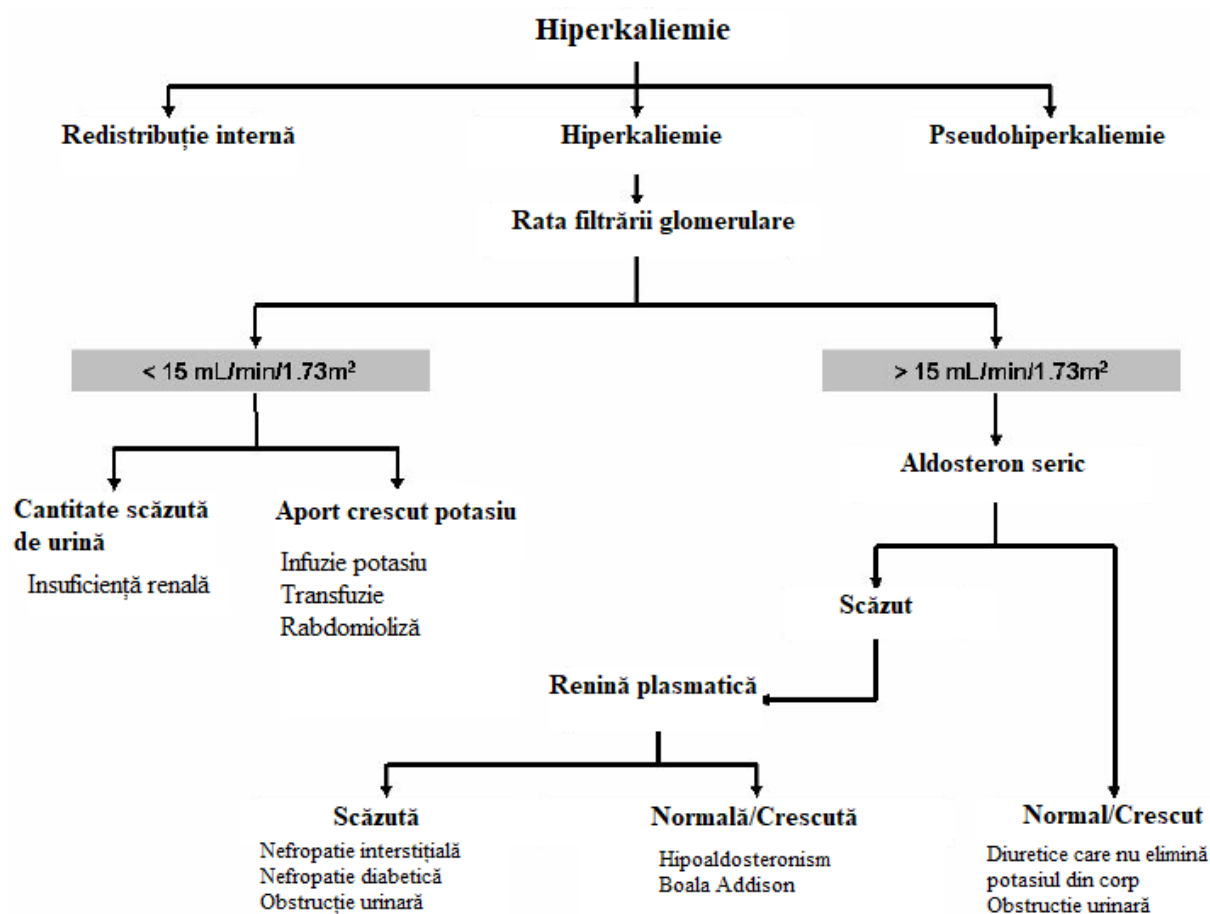


Figura 18-9. Diagnosticul diferențial al hiperkaliemiei.

### 18.6.2. Deficitul de potasiu

Hipokaliemia este întâlnită mai des decât hiperkaliemia, dar cazurile sunt mai puțin grave. Pacienții care riscă un deficit de potasiu sunt cei aflați în spitale, în special în secțiile psihiatrice, iar cauzele sunt tratamentele medicamentoase sau infecțiile. Hipokaliemia este comună în pacienții bolnavi, cu febră sau care sunt malnutriți. O formă de pseudohipokaliemie este înrudită cu perioada verii când schimbările temperaturii ambientale sunt atribuite unor creșteri metabolice a ionilor de sodiu, potasiu și a activității pompei de sodiu.

Pentru a diferenția cauzele hipokaliemiei (a se vedea și Tabelul 18-2), după efectuarea analizei potasiului seric are loc analiza potasiului urinar, pentru a determina dacă contribuția

majoritară a pierderii potasiului este de natură gastrointestinală sau urinară. Nu este necesară o analiză de 24 de ore; informații asemănătoare pot fi obținute din raportul între potasiu și creatinina urinară. Unde acest raport este mare, se consideră și prezența sau absența hipertensiunii. În absența hipertensiunii, alcaloza metabolică este specifică sindromului Bartter sau Gitelman. În prezența hipertensiunii, alcaloza metabolică sugerează abuzul de diuretice sau hipertensiune renovasculară, hiperaldosterism primar, sindrom Cushing, hiperplazie congenitală de suprarenale. Diagnosticul se pune după efectuarea analizelor aldosteronului și reninei, a cortizolului plasmatic și a celui liber în urină.

Tabelul 18-2. Markerii diagnosticării hipokaliemiei

Analiză	Valori diagnostic hipokaliemie
K <sup>+</sup> urinar	>20 mmol/24h
Raport potasiu/creatinină = (potasiu urinar x creatinină serică)/(potasiu seric x creatinină urinară) x 100%	>6.5%
Raport potasiu/osmolaritate = (potasiu urinar x osmolaritate plasmatică)/(potasiu seric x osmolaritate urinară)	>2
Raport potasiu urinar/creatinină	>12 mmol/g

Scopul imediat al tratamentului este de a crește concentrația potasiului seric pentru a preveni disfuncții cardiace și neuromusculare. În timpul tratamentului se va monitoriza constant concentrația, astfel încât acesta să nu determine o hiperkaliemie. De concentrația potasiului este dependentă și cea a magneziului, astfel încât concomitent cu hipokaliemia trebuie tratat și deficitul de potasiu. Dacă lipsa de potasiu este datorată diureticelor, se întrerupe administrarea acestora; o altă abordare este administrarea unor medicamente inhibitoare a enzimei de conversie a angiotensinei sau medicamente care blochează receptorii angiotensinei, deoarece acestea sunt asociate cu o creștere a concentrației serice a potasiului. Se poate suplimenta potasiul prin dietă, în cazurile unde hipokaliemia este minoră și care au în istoric hipertensiune și boli cardiace, dar efectivitatea acestui tratament este limitată. Tratamentul intravenos poate cauza hiperkaliemie și se utilizează doar pe cazurile grave, unde apar schimbări în electrocardiogramă și simptome fizice, în general, însă se preferă tratamentul oral. Potasiul intravenos trebuie să fie doar în soluție salină, nu și în dextroză deoarece acestea stimulează secreția de insulină și accentuează deficitul de potasiu.

### 18.7. Dezechilibre ale zincului

Zincul este un micronutrient esențial deoarece participă la numeroase procese chimice în celule. Corpul uman conține 2-3 g zinc, iar cantitatea cea mai mare se găsește în mușchi și oase, urmând inima și plasma. Peste 300 de enzime necesită zinc pentru activarea catalitică. Zincul se leagă cu peste 2500 de proteine, echivalentul a 10% din proteomul uman și multora le menține integritatea structurală, un exemplu fiind sintetaza oxidului nitric.

Zincul este utilizat sub formă de aliaje în domeniul dentar, medical și pentru uz casnic. În contrast cu fierul, cuprul, mercurul, cadmiul și alte metale care se acumulează în țesuturi și produc efecte toxice, se cunosc puține patologii asociate cu acumularea excesivă a zincului;

cele mai multe efecte toxice asociate cu zincul sunt rezultatul deficitului de cupru. Zincul administrat topic în bandaje sau creme este eficient în dezinfectarea și vindecarea rănilor. Zincul se regăsește sub formă de  $Zn^{2+}$  și este inert din punct de vedere redox, în schimb funcționează ca un acid Lewis și se leagă de aminoacizi precum acidul aspartic, acidul glutamic, cisteina și histidina. Printre funcțiile zincului se numără participarea la reacții catalitice, la transcrierea ADN-ului, dar și stabilizarea membranei celulare; de aceea, deficitul de zinc este asociat cu defecte de creștere, dezvoltare, funcționarea defectuoasă a sistemelor imunitar și reproductiv. Zincul poate deveni toxic dacă este inhalat sub formă de praf sau fum, sau dacă este ingerat.

În prezent nu există o analiză care să reflectă concentrația totală de zinc. Concentrația zincului din plasmă este analiza cea mai folosită, dar interpretarea acesteia este îngreunată de o serie de factori. Concentrația plasmatică a zincului poate să rămână în limite chiar și atunci când există un deficit de zinc, dar când încep să apară simptome, aceasta poate ajuta la diagnosticare. Deficitul de zinc poate fi datorată și unei expansiuni a plasmelor în condiții de sarcină, hemodiluție sau hipoalbumie, iar în cazul zincului nu se poate aranja concentrația acestuia în funcție de cea a albuminelor, precum în cazul calciului. O altă analiză este zincul din urină, de asemenea afectată însă de alți factori, de exemplu catabolismul. Zincul este necesar în efectele de creștere date de somatomedina C și în nivelul concentrației plasmatică ale acesteia, somatomedina C plasmatică având valori scăzute în deficitul de zinc, de aceea poate fi considerată un marker folosit pentru monitorizarea zincului. De asemenea, deficitul de zinc determină o absorbție mărită de cupru, ducând la un exces de cupru, care de asemenea poate fi folosit în diagnosticare.

Tratamentul deficitului de zinc se face prin suplimente de zinc; acestea s-au dovedit a fi benefice în tratamentul unor afecțiuni precum diareea în copiii mai mici de 5 ani, infecții, în tratamentul răcelii, în tratamentul bolii Wilson deoarece zincul este în competiție cu cuprul și de asemenea el are rol și în sinteza metalotioneinei, o proteină care blochează absorbția de cupru.

Excesul de zinc este mai puțin întâlnit; el a fost pus în evidență după folosirea îndelungată a adezivilor dentari pe bază de zinc, unde s-a diagnosticat în funcție de concentrația zincului seric mărită, iar a cuprului seric scăzută, electromiograma poate oferi de asemenea semne de polineuropatie. Tratamentul include tratarea deficitului de cupru pe cale orală sau intravenoasă și evitarea produselor cu zinc.

## 18.8. Cromul

Încă nu se cunoaște un locul de acțiune al complexilor de crom. Nu există nicio biomoleculă în organismul uman despre care să se știe că ar conține crom sau că necesită crom pentru buna funcționare; nu există niciun proces catalitic, metabolic, în organismul uman unde să existe date că cromul ar fi necesar. Mai mult, cromul hexavalent este carcinogen, fiind raportate cazuri de cancer la plămân după inhalare. Cromul care provine din dieta alimentară este absorbit prin difuzie pasivă și este menținut în sânge legat de transferină. În prezent nu există simptome ale deficitului de crom și nu există o relație între suplimentarea de crom cu beneficii ale sănătății umane; unele studii raportează efecte benefice ale cromului în gestionarea metabolismului glucidelor și posibil și al lipidelor, motiv pentru care în anumite țări (dar nu și în Uniunea Europeană) cromul este considerat micronutrient și este permisă folosirea lui în suplimente alimentare. Concentrațiile cromului fiind însă foarte mici, nu există date semnificative

despre tratamentul excesului sau deficitului de crom – și nici analize standard clinice care să îl aibă în obiectiv.

### 18.9. Cadmiul

Se folosește în unele domenii termenul de „metale grele” în mod impropriu, inclusiv pentru metalele tranziționale din prima perioadă. În această terminologie, pe care o adoptăm aici pentru coerență cu alte studii din domeniu, metalele grele se împart în două categorii: cele esențiale care în concentrații mici nu sunt dăunătoare organismului precum zinc, cupru, fier și cobalt și metale grele neesențiale care sunt toxice chiar de la concentrații mici, dintre acestea se pot menționa cadmiul, mercurul, arsenul și cromul. Acumularea în organism a metalelor grele neesențiale dăunează sistemelor respirator, nervos, reproductiv și digestiv. Arsenul, cadmiul și mercurul sunt în general inactive din punct de vedere redox în mediile biologice, dar induc stresul oxidativ prin inhibarea activității enzimatică a superoxid dismutazei sau prin legarea la grupările -SH ale proteinelor. Este discutat aici mai în detaliu cadmiul întrucât toxicitatea mercurului, arsenului sau plumbului sunt discutate mult mai des în alte surse.

Principala sursă de expunere la cadmiu este reprezentată de alimentele care provin din soluri contaminate. Efectele expunerii îndelungate la cadmiu sunt boala Itai-itai, boală caracterizată de osteoporoză și disfuncții renale, întâlnită în Japonia, efecte renale precum nefropatia tubulară care determină concentrații ridicate de proteine, aminoacizi și glucoză în urină, efecte asupra aparatului respirator precum dispnee, dureri toracice, edem pulmonar, au mai fost întâlnite și efecte asupra ficatului și neurologice.

Concentrația urinară a cadmiului este proporțională cu concentrația din rinichi, cadmiul este reabsorbit în mod eficient în rinichi, doar în cazuri de afecțiuni la nivel tubular, reabsorbția scade și crește concentrația cadmiului urinar, dar pe termen lung concentrația va rămâne scăzută și la nivel urinar, de aceea analiza cadmiului din sânge este mai utilă în evaluarea expunerii. O analiză utilă este cea a firelor de păr și a salivei, cadmiul acumulându-se în corp timp îndelungat și concentrația lui putând fi crescută și la câțiva ani după expunere. În diagnosticarea toxicității cadmiului se mai pot folosi nanoparticule care sunt realizate din seleniură de cadmiu sau sulfură de zinc marcate fluorescent. Tratamentul, în caz de edem presupune utilizarea diureticelor, dacă s-au ingerat doze mari nu are loc lavajul gastric, iar utilizarea cărbunelui activ nu și-a dovedit eficiența.

### 18.10. Nichelul

Nichelul este un metal foarte răspândit în industrie; el este utilizat la fabricarea bijuteriilor, ceasurilor, telefoanelor mobile, implanturilor dentare și ortopedice. Până în prezent nu se cunosc enzime din corpul uman care să utilizeze nichel, acest aspect și expunerea repetată la nichel de către om au dus la studierea lui din punct de vedere al aspectelor dăunătoare pe care le poate cauza, cele mai răspândite fiind dermatita de contact și carcinogeneza.

Nichelul este un metal tranzițional, se găsește în diferite stări de oxidare, dar cea mai întâlnită în sistemele biologice este  $\text{Ni}^{2+}$ . Datorită proprietăților sale este utilizat în diferite aliaje, în baterii alături de cadmiu și drept catalizator în industria chimică și alimentară. Până

în prezent nu se cunosc efecte nutritive ale nichelului asupra organismului uman, dar el este esențial pentru unele plante, animale și microorganisme. În funcție de doza și timpul de expunere, nichelul provoacă o varietate de afecțiuni precum dermatita de contact, boli cardiovasculare, astm, fibroză pulmonară și cancerul tractului respirator. Mecanismul molecular al neurotoxicității nichelului nu este încă elucidat, dar nichelul are un efect dăunător asupra mitocondriilor.

Toxicitatea dată de expunerea la nichel poate fi acută subcronică sau cronică. Simptomele intoxicației acute cu nichel includ greață, amețeală și starea de vomă. Acestea se pot manifesta de la câteva ore, la câteva zile, ulterior sunt urmate de simptome precum dureri în piept, tuse, tahicardie, palpitații, scăderea a vederii și dispnee. Toxicitatea cronică este datorată expunerii prelungite la vapori sau praf de nichel și determină apariția astmei sau bronșitei. Aceasta a indus și o pierdere a ionilor de zinc, calciu și fosfați prin urină. Principala preocupare merge către sărurile și aliajele din nichel, care provoacă dermatite de contact.

Nichelul este cauza principală a dermatitei de contact. Alergia la nichel se analizează prin teste alergologice cutanate localizate pe spatulele pacientului. Practic se folosește o soluție de 5% sulfat de nichel în vaselină deoarece este mai puțin iritant față de clorura de nichel, cu toate că aceasta se aproprie mai mult de rezultatele date de contactul aliajelor din nichel cu pielea. Reproducibilitatea și relevanța acestor teste s-a dovedit a fi mare. Pentru a stabili dacă este o alergie sau o iritație se face o diluție în serie cu săruri de nichel. Există alergii simultane la nichel-cobalt sau nichel-crom datorate expunerii la aliaje. Tratamentul eczemei se face cu corticosteroizi și inhibitori de calcineurină. În trecut, când aceste tratamente nu dădeau rezultate se foloseau agenți chelatizanti precum disulfiram sau tiotrilentetraamină, în prezent nu se mai folosesc din cauza efectelor secundare grave precum toxicitatea hepatică. Desensibilizarea nichelului prin aportul oral de nichel zilnic pe o perioadă de la câteva săptămâni la câteva luni a dus la o toleranță parțială la acest metal. Testul cu dimetilglioximă este util în detectarea nichelului din obiectele casnice; aceasta în contact cu nichelul produce o sare insolubilă de culoare roz.

## Bibliografie

- (1) Bischin, C.; Scurtu, V.-F.; Cioloboc, D.; Ghinga, R.; Silaghi-Dumitrescu, R. *O Scurtă Introducere În Biochimie*; Presa Universitara Clujeana: Cluj-Napoca, Romania, 2015.
- (2) *Celulă (biologie)* – Wikipedia. [https://ro.wikipedia.org/wiki/Celulă\\_\(biologie\)](https://ro.wikipedia.org/wiki/Celulă_(biologie)) (accessed 2023-08-03).
- (3) *De la MesserWoland și Szczepan1990 – Own work using:Inkscape. micro.magnet.fsu.edu. Retrieved on 2022-12-09., CC BY-SA 3.0.* <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1279365>.
- (4) Silaghi-Dumitrescu, R. *Metalele În Sistemele Vii*; 2010.
- (5) *Crystal field theory*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Crystal\\_field\\_theory](https://en.wikipedia.org/wiki/Crystal_field_theory).
- (6) Ghizdavu, L. *Chimie Bioanorganica*; Editura Poliam: Cluj-Napoca, 2000.
- (7) *Abundances of the elements (data page)*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Abundances\\_of\\_the\\_elements\\_\(data\\_page\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Abundances_of_the_elements_(data_page)).
- (8) *Mineral (nutrient)*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Mineral\\_\(nutrient\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Mineral_(nutrient)).
- (9) Crainic, A.-M.; Moț, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Isolation, Purification and Characterization of Ascorbate Oxidase and Peroxidase from Cucurbita Pepo Medullosa. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2019**, 64 (2Tom1). <https://doi.org/10.24193/subbchem.2019.2.04>.
- (10) Scurtu, V.-F.; Moț, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Protein-Based Blood Substitutes: Recent Attempts at Controlling pro-Oxidant Reactivity with and beyond Hemoglobin. *Pharmaceuticals* **2013**, 6 (7), 867–880. <https://doi.org/10.3390/ph6070867>.
- (11) Das, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Ljungdahl, L. G.; Kurtz, D. M. Cytochrome Bd Oxidase, Oxidative Stress, and Dioxygen Tolerance of the Strictly Anaerobic Bacterium Moorella Thermoacetica. *Journal of Bacteriology* **2005**, 187 (6), 2020–2029. <https://doi.org/10.1128/Jb.187.6.2020-2029.2005>.
- (12) Silaghi-Dumitrescu, R.; Coulter, E. D. D.; Das, A.; Ljungdahl, L. G. G.; Jameson, G. N. L. N. L.; Huynh, B. H. H.; Kurtz Jr., D. M. M.; Kurtz, D. M. J.; Kurtz Jr., D. M. M. A Flavodiiron Protein and High Molecular Weight Rubredoxin from Moorella Thermoacetica with Nitric Oxide Reductase Activity. *Biochemistry* **2003**, 42 (10), 2806–2815.
- (13) Arkosi, M.; Scurtu, F.; Vulpoi, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Kurtz, D.; Kurtz Jr., D. M. Copolymerization of Recombinant P. Gouldii Hemerythrin with Human Serum Albumin for Use in Blood Substitutes. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* **2017**, 45 (2), 218–223. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1269118>.
- (14) Iyer, R.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Kurtz, D. M.; Lanzilotta, W. N. High-Resolution Crystal Structures of Desulfovibrio Vulgaris (Hildenborough) Nigerythrin: Facile, Redox-Dependent Iron Movement, Domain Interface Variability, and Peroxidase Activity in the Rubrerythrins. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2005**, 10 (4), 407–416. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0650-8>.
- (15) Silaghi-Dumitrescu, R.; Ng, K. Y.; Viswanathan, R.; Kurtz, D. M.; Kim, Y. N.; Viswanathan, R.; Kurtz Jr., D. M. A Flavo-Diiron Protein from Desulfovibrio Vulgaris with Oxidase and Nitric Oxide Reductase Activities. Evidence for an in Vivo Nitric Oxide Scavenging Function. *Biochemistry* **2005**, 44 (9), 3572–3579.
- (16) Hathazi, D.; Moț, A. C.; Vaida, A.; Scurtu, F.; Lupan, I.; Fischer-Fodor, E.; Damian, G.; Kurtz Jr., D. M.; Silaghi-Dumitrescu, R. Oxidative Protection of Hemoglobin and Hemerythrin by Cross-Linking with a Nonheme Iron Peroxidase: Potentially Improved Oxygen Carriers for Use in Blood Substitutes. *Biomacromolecules* **2014**, 15 (5), 1920–1927. <https://doi.org/10.1021/bm5004256>.

- (17) Silaghi-Dumitrescu, R.; Kurtz, D. M.; Lanzilotta, W. N.; Kurtz, D. M.; Ljungdahl, L. G.; Lanzilotta, W. N.; Kurtz, D. M.; Lanzilotta, W. N.; Ljungdahl, L. G.; Lanzilotta, W. N. X-Ray Crystal Structures of Moorella Thermoacetica FprA. Novel Diiron Site Structure and Mechanistic Insights into a Scavenging Nitric Oxide Reductase,. *Biochemistry* **2005**, 44 (17), 6492–6501. <https://doi.org/10.1021/bi0473049>.
- (18) Sutherland-Smith, A. J.; Baker, H. M.; Hofmann, O. M.; Brittain, T.; Baker, E. N. Crystal Structure of a Human Embryonic Haemoglobin: The Carbonmonoxy Form of Gower II ( $\alpha 2 \epsilon 2$ ) Haemoglobin at 2.9 Å Resolution 1 1 Edited by K. Nagai. *Journal of Molecular Biology* **1998**, 280 (3), 475–484. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1868>.
- (19) Wagenbach, M.; O'Rourke, K.; Vitez, L.; Wieczorek, A.; Hoffman, S.; Durfee, S.; Tedesco, J.; Stetler, G. Synthesis of Wild Type and Mutant Human Hemoglobins in Saccharomyces Cerevisiae. *Nature Biotechnology* **1991**, 9 (1), 57–61. <https://doi.org/10.1038/nbt0191-57>.
- (20) Mot, A. C.; Damian, G.; Sarbu, C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Redox Reactivity in Propolis: Direct Detection of Free Radicals in Basic Medium and Interaction with Hemoglobin. *Redox Report* **2009**, 14 (6), 267–274. <https://doi.org/10.1179/135100009X12525712409814>.
- (21) Mot, A. C.; Roman, A.; Lupan, I.; Kurtz, D. M.; Silaghi-Dumitrescu, R. Towards the Development of Hemerythrin-Based Blood Substitutes. *The Protein Journal* **2010**, 29 (6), 387–393. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9264-2>.
- (22) Silaghi-Dumitrescu, R.; Kurtz, D. M.; Lanzilotta, W. N. 1YCH: X-Ray Crystal Structures of Moorella Thermoacetica FprA. Novel Diiron Site Structure and Mechanistic Insights into a Scavenging Nitric Oxide Reductase. *Protein Data Bank*. 2005. <https://doi.org/10.2210/pdb1ych/pdb>.
- (23) Cioloboc, D.; Arkosi, M.-K.; Silaghi-Dumitrescu, R. A New Protocol for Purifying Human Serum Albumin. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2013**, 2013 (3).
- (24) Moț, A. C.; Coman, C.; Miron, C.; Damian, G.; Sarbu, C.; Silaghi-Dumitrescu, R. An Assay for Pro-Oxidant Reactivity Based on Phenoxyl Radicals Generated by Laccase. *Food Chem* **2014**, 143, 214–222. <https://doi.org/DOI.10.1016/j.foodchem.2013.07.128>.
- (25) KingisNitro, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via W. C. *Protein\_circular\_dichroism\_spectrum.png*. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein\\_circular\\_dichroism\\_spectrum.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_circular_dichroism_spectrum.png).
- (26) Decker, A.; Solomon, E. I. Dioxygen Activation by Copper, Heme and Non-Heme Iron Enzymes: Comparison of Electronic Structures and Reactivities. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9 (2), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.012>.
- (27) Szilagyi, R. K.; Metz, M.; Solomon, E. I. Spectroscopic Calibration of Modern Density Functional Methods Using [CuCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>. *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106 (12), 2994–3007.
- (28) By TungstenEinsteinium – Own work, CC BY-SA 4.0, H. [wikimedia.org/w/index.php?curid=9231203](http://wikimedia.org/w/index.php?curid=9231203). *The UV/Vis absorption (top) and MCD (bottom) spectra of tetra-n-butylammonium tetracyanoplatinate in acetonitrile*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Magnetic\\_circular\\_dichroism#/media/File:Tetrabutylammonium\\_Tetracyanoplatinate\\_Magnetic\\_Circular\\_Dichroism.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Magnetic_circular_dichroism#/media/File:Tetrabutylammonium_Tetracyanoplatinate_Magnetic_Circular_Dichroism.svg).
- (29) Puscas, C.; Radu, L.; Carrascoza, F.; Mot, A. C.; Amariei, D.; Lungu, O.; Scurtu, F.; Podea, P.; Septelea, R.; Matei, A.; Mic, M.; Attia, A. A.; Silaghi-Dumitrescu, R. The High Affinity of Small-Molecule Antioxidants for Hemoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, 124, 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.019>.
- (30) Silaghi-Dumitrescu, R. PhD Thesis, University of Georgia, 2004.
- (31) Deac, F. V.; Todea, A.; Bolfa, A. M.; Podea, P.; Petrar, P.; Silaghi-Dumitrescu, R. Ascorbate Binding To Globins. *Rom. J. Biochem.* **2009**, 46 (2), 115–121.
- (32) By Munzarin at English Wikipedia, C. B.-S. 3. . *Three regions of XAS data*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Extended\\_X-ray\\_absorption\\_fine\\_structure#/media/File:XASFig.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Extended_X-ray_absorption_fine_structure#/media/File:XASFig.jpg).

- (33) *XANES: Application – Chemistry LibreTexts*. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/X-ray\\_Spectroscopy/XANES%3A\\_Application](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/X-ray_Spectroscopy/XANES%3A_Application) (accessed 2023-02-25).
- (34) Von Dreele, R. B.; Stephens, P. W.; Smith, G. D.; Blessing, R. H. The First Protein Crystal Structure Determined from High-Resolution X-Ray Powder Diffraction Data: A Variant of T 3 R 3 Human Insulin–Zinc Complex Produced by Grinding. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **2000**, *56* (12), 1549–1553. <https://doi.org/10.1107/S0907444900013901>.
- (35) David, W. I. F.; Shankland, K. Structure Determination from Powder Diffraction Data. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography* **2008**, *64* (1), 52–64. <https://doi.org/10.1107/S0108767307064252>.
- (36) Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. Cryo-EM Structure of the 2019-NCov Spike in the Prefusion Conformation. *Science* **2020**, *367* (6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>.
- (37) Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M. Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molecular Structure with the Physical Properties of the Walls during Growth. *The Plant Journal* **1993**, *3* (1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>.
- (38) Davydov, R.; Kofman, V.; Fuji, H.; Yoshida, T.; Ikeda-saito, M.; Hoffman, B. M. Catalytic Cycle of Heme Oxygenase through EPR and ENDOR of Cryoreduced Oxy-Heme Oxygenase and Its Asp140 Mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1798–1808.
- (39) Davydov, R.; Osborne, R. L.; Kim, S. H.; Dawson, J. H.; Hoffman, B. M. EPR and ENDOR Studies of Cryoreduced Compounds II of Peroxidases and Myoglobin. Proton-Coupled Electron Transfer and Protonation Status of Ferryl Hemes. *Biochemistry* **2008**, *47* (18), 5147–5155.
- (40) Silaghi-Dumitrescu, R.; Scurtu, F.; Mason, M. G.; Svistunenko, D. A.; Wilson, M. T.; Cooper, C. E. The Reaction of Oxyhemoglobin with Nitric Oxide: EPR Evidence for an Iron(III)-Nitrate Intermediate. *Inorganica Chimica Acta* **2015**, *436*, 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.07.037>.
- (41) Svistunenko, D. A. A.; Reeder, B. J. J.; Wankasi, M. M. M.; Silaghi-Dumitrescu, R.-L. L.; Cooper, C. E. E.; Rinaldo, S.; Cutruzzola, F.; Wilson, M. T. T.; Cutruzzola, F.; Wilson, M. T. T. Reaction of Aplysia Limacina Metmyoglobin with Hydrogen Peroxide. *Dalton Transactions* **2007**, No. 8, 840–850.
- (42) Mot, A. C.; Puscas, C.; Miclea, P.; Naumova-Letia, G.; Dorneanu, S.; Podar, D.; Dissmeyer, N.; Silaghi-Dumitrescu, R. Redox Control and Autoxidation of Class 1, 2 and 3 Phytoglobins from Arabidopsis Thaliana. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31922-4>.
- (43) Arkosi, M.; Scurtu, F.; Vulpoi, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Kurtz, D. Copolymerization of Recombinant *Phascolopsis Gouldii* Hemerythrin with Human Serum Albumin for Use in Blood Substitutes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2017**, *45* (2), 218–223. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1269118>.
- (44) Toma, V. A.; Farcas, A. D. A. D.; Roman, I.; Sevastre, B.; Hathazi, D.; Scurtu, F.; Damian, G.; Silaghi-Dumitrescu, R. In Vivo Evaluation of Hemerythrin-Based Oxygen Carriers: Similarities with Hemoglobin-Based Counterparts. *Int J Biol Macromol.* **2017**, *107*, 1422–1427. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.005>.
- (45) Takacs, M. I.; Mot, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Damian, G. Site Directed Spin Labeling of Hemerythrin and Hemoglobin. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2013**, *58* (2), 61–69.
- (46) Isaza, C. E.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Iyer, R. B.; Kurtz, D. M.; Chan, M. K. Structural Basis for O(2) Sensing by the Hemerythrin-like Domain of a Bacterial Chemotaxis Protein: Substrate Tunnel and Fluxional N Terminus. *Biochemistry* **2006**, *45* (30), 9023–9031. <https://doi.org/10.1021/bi0607812>.
- (47) Silaghi-Dumitrescu, R. Superoxide Interaction with Nickel and Iron Superoxide Dismutases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2009**, *28* (2), 156–161. <https://doi.org/DOI.10.1016/j.jmglm.2009.06.001>.



- (48) Silaghi-Dumitrescu, R. The “Push” Effect of the Thiolate Axial Ligand in Superoxide Reductase: A Density Functional Study. *Revue Roumaine de Chimie* **2008**, 53 (12), 1149–1156.
- (49) Attia, A. A. A.; Cioloboc, D.; Lupan, A.; Silaghi-Dumitrescu, R. Multiconfigurational and DFT Analyses of the Electromeric Formulation and UV–Vis Absorption Spectra of the Superoxide Adduct of Ferrous Superoxide Reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, 165, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.09.017>.
- (50) Silaghi-Dumitrescu, R.; Cioloboc, D. Comparative Computational Characterization of Ferric Cytochrome P450 and Superoxide Reductase Binding to Cyanide. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2016**, 61 (3).
- (51) Silaghi-Dumitrescu, R.; Silaghi-Dumitrescu, I.; Coulter, E. D.; Kurtz Jr., D. M. Computational Study of the Non-Heme Iron Active Site in Superoxide Reductase and Its Reaction with Superoxide. *Inorg Chem* **2003**, 42 (2), 446–456.
- (52) Cooper, C. E.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Rukengwa, M.; Alayash, A. I.; Buehler, P. W. Peroxidase Activity of Hemoglobin towards Ascorbate and Urate: A Synergistic Protective Strategy against Toxicity of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOC). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* **2008**, 1784 (10), 1415–1420. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.03.019>.
- (53) Silaghi-Dumitrescu, R. The Nature of the High-Valent Complexes in the Catalytic Cycles of Hemoproteins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2004**, 9 (4), 471–476. <https://doi.org/DOI 10.1007/s00775-004-0543-2>.
- (54) Puscas, C.; Mircea, A.; Raiu, M.; Mic, M.; Attia, A. A. A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; A. A. Attia, A.; Silaghi-Dumitrescu, R. Affinity and Effect of Anticancer Drugs on the Redox Reactivity of Hemoglobin. *Chemical Research in Toxicology* **2019**, 32 (7), 1402–1411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00094>.
- (55) Silaghi-Dumitrescu, R.; Reeder, B. J. J.; Nicholls, P.; Cooper, C. E. E.; Wilson, M. T. T. Ferryl Haem Protonation Gates Peroxidatic Reactivity in Globins. *Biochemical Journal* **2007**, 403 (3), 391–395.
- (56) Silaghi-Dumitrescu, R. Halide Activation by Heme Peroxidases: Theoretical Predictions on Putative Adducts of Halides with Compound I. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2008**, No. 34, 5404–5407. <https://doi.org/DOI 10.1002/ejic.200800732>.
- (57) Silaghi-Dumitrescu, R.; Amthor, S.; Paizs, C.; Majdik, C.; Tosa, M.; Moldovan, P.; Sas, A.; Tamas, L.; Irimie, F. D. Horseradish Peroxidase – Catalyzed Oxidation of Water – Insoluble Phenothiazines. *Studia Univ. Babes-Bolyai, Chemia* **2003**, 48, 165.
- (58) Silaghi-Dumitrescu, R. Horseradish Peroxidase – a Versatile Catalyst. *Horseradish peroxidase – a versatile catalyst. Research Signpost, India* **2006**.
- (59) Bischin, C.; Deac, F.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Worrall, J. A. R. A. R.; Rajagopal, B. S. S.; Damian, G.; Cooper, C. E. E. Ascorbate Peroxidase Activity of Cytochrome C. *Free Radical Research* **2011**, 45 (4), 439–444.
- (60) Silaghi-Dumitrescu, R.; Kurtz Jr., D. M. High-Resolution Crystal Structures and Spectroscopy of Native and Compound I Cytochrome c Peroxidase. *Chemtracts* **2003**, 16 (12).
- (61) Silaghi-Dumitrescu, R.; Irimie, F. D.; Paizs, C.; Majdik, C.; Tosa, M.; Moldovan, P.; Sas, A.; Tamas, L. Horseradish Peroxidase Catalyzed Oxidation of Some Benzyl-Type Alcohols. *Studia Univ. Babes-Bolyai, Chemia* **2003**, 48, 177–182.
- (62) Arkosi, M. K.; Deac, F.; Silaghi-Dumitrescu, R. Hemoglobin Peroxidase Activity: Interaction with Hydroquinone and Anthracene. In *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology Tome IX*; Silaghi-Dumitrescu, R., Garban, G., Eds.; Cluj University Press: Cluj-Napoca, Romania, 2009; pp 99–110.
- (63) Silaghi-Dumitrescu, R. Assays for Peroxidase Activity: The HRP Case. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2010**, No. 3, 207–222.

- (64) Silaghi-Dumitrescu, R. Dioxygen Activation by Rieske Dioxygenases-Computational Studies. 1. Possible Catalytic Intermediates. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia* **2007**, 52 (2), 103–126.
- (65) Mot, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Laccases: Complex Architectures for One-Electron Oxidations. *Biochemistry. Biokhimiia* **2012**, 77 (12), 1395–1407. <https://doi.org/10.1134/S0006297912120085>.
- (66) Mirica, L. M.; Ottenwaelder, X.; Stack, T. D. Structure and Spectroscopy of Copper-Dioxygen Complexes. *Chem Rev* **2004**, 104 (2), 1013–1045.
- (67) Attia, A. A. A.; Silaghi-Dumitrescu, R. Nickel-Substituted Iron-Dependent Cysteine Dioxygenase: Implications for the Dioxygenation Activity of Nickel Model Compounds. *International Journal of Quantum Chemistry* **2018**, 118 (13), e25564. <https://doi.org/10.1002/qua.25564>.
- (68) Lupan, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; King, R. B. Tetracapped Tetrahedral Ruthenium-Sulfur Clusters Related to Iron-Sulfur Structural Units in Metalloenzymes. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, 475, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.10.011>.
- (69) Lupan, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; King, R. B. Tetracapped Tetrahedral Ruthenium-Sulfur Clusters Related to Iron-Sulfur Structural Units in Metalloenzymes. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, 475, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.10.011>.
- (70) *PROMISE database*. <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/MAIN.html>.
- (71) Lupan, A.; Matyas, C.; Mot, A.; Silaghi-Dumitrescu, R. Can Geometrical Distortions Make a Laccase Change Color from Blue to Yellow? *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2011**, 56 (3), 231–238.
- (72) Mot, A. C.; Coman, C.; Hadade, N.; Damian, G.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Heering, H. “Yellow” Laccase from *Sclerotinia sclerotiorum* Is a Blue Laccase That Enhances Its Substrate Affinity by Forming a Reversible Tyrosyl-Product Adduct. *PLoS ONE* **2020**, 15 (1), : e0225530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225530>.
- (73) Silaghi-Dumitrescu, R.; Mich, M.; Matyas, C.; Cooper, C. E. E. Nitrite and Nitrate Reduction by Molybdenum Centers of the Nitrate Reductase Type: Computational Predictions on the Catalytic Mechanism. **2012**, 26 (1), 27–31.
- (74) Daumann, L. J. Essential and Ubiquitous: The Emergence of Lanthanide Metallobiochemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, 58 (37), 12795–12802. <https://doi.org/10.1002/anie.201904090>.
- (75) Singer, H.; Drobot, B.; Zeymer, C.; Steudtner, R.; Daumann, L. J. Americium Preferred: Lanmodulin, a Natural Lanthanide-Binding Protein Favors an Actinide over Lanthanides. *Chemical science* **2021**, 12 (47), 15581–15587. <https://doi.org/10.1039/D1SC04827A>.
- (76) Silaghi-Dumitrescu, R. Copper-Containing Nitrite Reductase: A DFT Study of Nitrite and Nitric Oxide Adducts. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100 (3), 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.001>.
- (77) Silaghi-Dumitrescu, R. Linkage Isomerism in Nitrite Reduction by Cytochrome Cd1 Nitrite Reductase. *Inorganic Chemistry* **2004**, 43 (12), 3715–3718.
- (78) Silaghi-Dumitrescu, R. Nitric Oxide Reduction by Heme-Thiolate Enzymes (P450<sub>nor</sub>): A Reevaluation of the Mechanism. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2003**, No. 6, 1048–1052.
- (79) Brânzanic, A. M. V. V.; Ryde, U.; Silaghi-Dumitrescu, R. Importance of the Iron–Sulfur Component and of the Siroheme Modification in the Resting State of Sulfite Reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2020**, 203, 110928. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110928>.
- (80) Silaghi-Dumitrescu, R.; Makarov, S. V. Siroheme-Containing Sulfite Reductase: A Density Functional Investigation of the Mechanism. *International Journal of Quantum Chemistry* **2012**, 112 (3), 900–908. <https://doi.org/10.1002/qua>.

- (81) Brânzanic, A. M. V.; Ryde, U.; Silaghi-Dumitrescu, R. Why Does Sulfite Reductase Employ Siroheme? *Chemical Communications* **2019**, 55 (93), 14047–14049. <https://doi.org/10.1039/c9cc05271b>.
- (82) Mot, A. C.; Puscas, C.; Dorneanu, S. A.; Silaghi-Dumitrescu, R. EPR Detection of Sulfanyl Radical during Sulfhemoglobin Formation – Influence of Catalase. *Free Radical Biology and Medicine* **2019**, 137, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.034>.
- (83) Mot, A. C.; Bischin, C.; Damian, G.; Attia, A. A. A.; Gal, E.; Dina, N.; Leopold, N.; Silaghi-Dumitrescu, R. Fe(III) – Sulfide Interaction in Globins: Characterization and Quest for a Putative Fe(IV)-Sulfide Species. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, 179. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.015>.
- (84) Makarov, S. V.; Horváth, A. K.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Gao, Q. *Sodium Dithionite, Rongalite and Thiourea Oxides*; World Scientific (Europe), 2016. <https://doi.org/10.1142/q0028>.
- (85) Makarov, S. V.; Horvath, A. K.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Gao, Q.; Horváth, A. K.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Gao, Q. Recent Developments in the Chemistry of Thiourea Oxides. **2014**, 20 (44), 14164–14176. <https://doi.org/10.1002/chem.201403453>.
- (86) Sand, W.; Dopson, M.; Levicán, G.; Á, S.; Ferrer, A.; Rivera, J.; Zapata, C.; Norambuena, J.; Sandoval, Á.; Chávez, R.; Orellana, O. Cobalamin Protection against Oxidative Stress in the Acidophilic Iron-Oxidizing Bacterium *Leptospirillum* Group II CF-1. *Frontiers in Microbiology* **2016**, 7, 748. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00748>.
- (87) GPL, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1202121>.
- (88) Silaghi-Dumitrescu, R. Nitrile Hydration by the Cobalt-Containing Nitrile Hydratase DFT Investigation of the Mechanism. *Revista de Chimie* **2005**, 56 (4), 359–362.
- (89) Dereven'kov, I. A.; Salnikov, D. S.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Makarov, S. V.; Koiffman, O. I. Redox Chemistry of Cobalamin and Its Derivatives. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, 309, 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.001>.
- (90) Silaghi-Dumitrescu, R. Bioorganometallic Complexes Relevant to the “Push Effect” in Hemoproteins. *Proc. Rom. Acad. Series B* **2004**, 3, 149–154.
- (91) Kraatz, H. B.; Metzler-Nolte, N. *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
- (92) Silaghi-Dumitrescu, R. Redox Activation of Small Molecules at Biological Metal Centers. *Structure & Bonding* **2013**, 150, 97–118.
- (93) Meisel, J. D.; Kim, D. H. Inhibition of Lithium-Sensitive Phosphatase BPNT-1 Causes Selective Neuronal Dysfunction in *C. Elegans*. *Current Biology* **2016**, 26 (14), 1922–1928. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.050>.
- (94) Nonaka, S.; Hough, C. J.; Chuang, D. M. Chronic Lithium Treatment Robustly Protects Neurons in the Central Nervous System against Excitotoxicity by Inhibiting N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Calcium Influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95 (5), 2642–2647. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.5.2642/ASSET/D744418F-90AF-4930-9DDA-5D79D2AE5660/ASSETS/GRAPHIC/PQ0682559006.JPEG>.
- (95) Götttert, R.; Fidzinski, P.; Kraus, L.; Schneider, U. C.; Holtkamp, M.; Endres, M.; Gertz, K.; Kronenberg, G. Lithium Inhibits Tryptophan Catabolism via the Inflammation-Induced Kynurenine Pathway in Human Microglia. *GLIA* **2022**, 70 (3), 558–571. <https://doi.org/10.1002/glia.24123>.
- (96) Kuchar, J.; Hausinger, R. P. Biosynthesis of Metal Sites. *Chemical Reviews* **2004**, 104 (2), 509–525. <https://doi.org/10.1021/cr020613p>.
- (97) Tomoiaga, N. MSc Thesis: Patologii Provocate de Dezechilibre Ale Ionilor Metalici: Analize Și Gestionare, Babes-Bolyai University, 2020.



ISBN: 978-606-37-1937-0